



**Cláudia Maria
Machado Tavares**

**Gelificação de misturas proteínicas do soro do leite –
galactomananas: efeito do grau de ramificação do
polissacarídeo**



**Cláudia Maria
Machado Tavares**

**Gelificação de misturas proteínas do soro do leite –
galactomananas: efeito do grau de ramificação do
polissacarídeo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química de Produtos Naturais e Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Teixeira Lopes da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Ao Jorge

o júri

presidente

Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro
professor catedrático da Universidade de Aveiro

Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa
professora auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
professor auxiliar da Universidade de Aveiro (Orientador)

agradecimentos

Ao Doutor José António Lopes da Silva agradeço a sua orientação científica, o seu empenho e incentivo neste trabalho e a sua paciência e disponibilidade ao longo destes anos.

Ao Doutor Manuel António Coimbra quero agradecer os conhecimentos científicos que me transmitiu.

Quero também agradecer ao Doutor António Calado, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, pela ajuda que me dispensou na microscopia electrónica e ao Doutor Nuno Moreno, do Instituto Gulbenkian de Ciência, pela ajuda dispensada na microscopia confocal de varrimento de laser.

À minha amiga Sónia Regina Monteiro o meu agradecimento pelo companheirismo e apoio nas longas horas de trabalho.

Agradeço também às minhas amigas Sofia Capela, Susana Cardoso, Dora Santos, Patrícia Seabra, Carla Santos, Sónia Carneiro e Isabel Ávila pelo seu imenso apoio e incentivo e a todos os colegas do Departamento de Química que de algum modo me ajudaram na execução deste trabalho.

Ao Jorge, aos meus pais, aos meus irmãos, à tia Olguette, à Madrinha, à Mary e ao Rafael quero deixar aqui o meu mais sincero agradecimento pelo seu constante encorajamento e compreensão.

Finalmente agradeço à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro concedido no âmbito do projecto POCTI/33626/BIO/2000.

palavras-chave

Proteínas do soro do leite, galactomananas, gelificação de proteínas, reologia, microscopia, interações proteínas-polissacarídeos.

resumo

O objectivo do presente trabalho foi o estudo da influência da adição de polissacarídeos neutros na gelificação das proteínas do soro do leite.

Os polissacarídeos estudados foram galactomananas com origem em farinhas de alfarroba, guar e tara. A amostra de proteína estudada foi um isolado de proteínas do soro do leite.

Para o estudo do efeito do grau de ramificação das galactomananas utilizaram-se as amostras obtidas de diferentes origens e também amostras com diferentes graus de ramificação, mas com massa molecular semelhante, obtidas por hidrólise enzimática das amostras originais com α -galactosidase. A gama de razões manose/galactose estudada foi de 1,5 a 5,3.

O comportamento reológico das galactomananas em solução aquosa foi estudado em regime de escoamento estacionário e em regime dinâmico.

Comparando as amostras de galactomananas com massa molecular semelhante, verificou-se que a diminuição do grau de ramificação provocou um aumento da viscosidade intrínseca e, igualmente, o aumento da viscosidade aparente em regime concentrado.

Realizaram-se ensaios reológicos dinâmicos para avaliar o efeito da adição das galactomananas na gelificação do isolado de proteínas do soro do leite em solução aquosa, em condições de baixa força iónica e a dois valores diferentes de pH: 5 e 7. Por observação visual constatou-se que os géis do isolado de proteínas do soro do leite a pH7 apresentaram-se translúcidos e homogêneos, tendo a opacidade aumentado com o aumento da quantidade de polissacarídeo adicionado. A pH 5 os géis apresentaram-se completamente opacos.

Em condições de pH neutro verificou-se que a adição destes polissacarídeos aumentou os valores dos módulos de conservação e de perda do gel produzido, dentro da gama de concentrações testada. Para além disso a concentração crítica de proteína para a gelificação diminuiu, assim como a temperatura de gelificação. Pelo contrário, a pH próximo do ponto isoeléctrico das proteínas do soro do leite, o efeito da adição de galactomananas dependeu da concentração de proteína. Para uma concentração mais alta de proteína a adição de galactomananas teve um efeito semelhante ao verificado a pH 7, enquanto que para concentrações mais baixas de proteína, dentro da gama estudada, verificou-se o efeito contrário. Estes efeitos foram mais pronunciados com o aumento da concentração dos polissacarídeos.

O efeito da razão manose/galactose foi quantitativamente e qualitativamente insignificante para as amostras de galactomananas estudadas excepto para a amostra de guar não modificada que apresentou, em termos quantitativos uma influência menor que as restantes, na gelificação das proteínas do soro do leite a pH 7.

A microestrutura dos géis foi observada por técnicas microscópicas, nomeadamente por microscopia confocal de varrimento de laser para os géis a pH 7 e microscopia electrónica de varrimento para os géis a pH 5. Estas técnicas vieram confirmar algumas das conclusões que a reologia evidenciou.

A análise microscópica revelou sistemas com separação de fases. A pH 7 para as concentrações mais baixas de galactomananas verificou-se a presença de uma fase dispersa correspondente essencialmente a gotículas esféricas compostas maioritariamente por polissacarídeo, e de uma fase contínua constituída maioritariamente por proteína. À medida que a concentração de galactomanana aumentou verificou-se o aumento das gotículas da fase dispersa, a sua coalescência e tendência para a formação de uma fase contínua composta maioritariamente por polissacarídeo, contribuindo para uma maior descontinuidade da fase proteica gelificada. Este efeito não se verificou para a amostra com a menor razão manose/galactose.

A amostra de guar não modificada, aquela com menor razão manose/galactose, exibiu uma menor influência, quando comparada com as outras galactomananas estudadas, quer no comportamento viscoelástico dos géis de isolado de proteína do soro do leite quer na sua organização microestrutural.

keywords

Whey proteins, galactomannans, protein gelation, rheology, microscopy, protein-polysaccharide interactions.

abstract

The aim of the present work was to study the influence of the addition of neutral polysaccharides on the gelation of whey proteins.

The studied polysaccharides were galactomannans from locust bean gum, guar gum and tara gum. The studied protein sample was a whey protein isolate.

For the study of the effect of the galactomannan's degree of branching we used galactomannans from different origins and also samples with different degrees of branching, but with similar molecular weight, obtained by controlled enzymatic hydrolysis of the original samples, with α -galactosidase. The range of manose-to-galactose ratio studied was from 1.5 to 5.3.

The rheological behaviour of the galactomannans in aqueous solutions was studied in steady-shear flow and in dynamic shear.

Comparing the samples with similar molecular weight, we verified that lowering the degree of branching, the intrinsic viscosity increased and also increased the apparent viscosity for the concentrated regime.

Dynamic rheological tests were performed to evaluate the effect of the addition of galactomannans on the gelation of a whey protein isolate in aqueous solutions at low ionic strength and at two different values of pH: 5 and 7. We observed by visual inspection that the whey protein gels, at pH 7, were translucent and homogeneous and that the addition of the polysaccharides caused an increase in the gel turbidity. For pH 5 opaque coarse gels were obtained.

In conditions of neutral pH we observed that higher elastic and viscous moduli were obtained with the addition of these polysaccharides, within the range of concentrations tested. Add to that, the critical gelation concentration of protein diminished, as well as the gelation temperature. However, when the pH was close to the isoelectric point of the whey proteins the effect of the polysaccharides was negative or positive depending on the protein concentration. For higher protein concentrations the effect of the addition of the galactomannans was similar to that at pH 7. However, for lower protein concentrations we verified the opposite effect. These effects were more pronounced for higher polysaccharide concentrations.

Essentially, no observed quantitative and qualitative effects of the manose-to-galactose ratio was for all galactomannan samples except for the unmodified guar sample, for which the quantitative effect, on whey protein gelation at pH 7, was less pronounced.

The gels' microstructures were observed by microscopic techniques namely by confocal laser scanning microscopy for the gels at pH 7, and scanning electron microscopy, for the gels at pH 5. These techniques confirmed some of the conclusions taken from rheology.

Microscopic analysis revealed phase-separated systems. For pH 7 and at lower galactomannan concentrations the dispersed phase consisted basically in spherical droplets devoid of protein. As the concentration of galactomannans increased, a new continuous phase of polysaccharide was originated. This effect was not observed for the galactomannan sample with the smallest manose-to-galactose ratio.

Índice

Júri	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Lista de abreviaturas e símbolos	xiii
Índice de Tabelas	xv
Índice de figuras	xvi
Introdução Geral	xxi
 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE ASSUNTOS	 1
1.1. Gelificação das proteínas do soro do leite	1
1.1.1. Introdução	1
1.1.2. Constituição e características do soro do leite	2
1.1.3. Mecanismo de gelificação de proteínas globulares	2
1.1.4. Factores que influenciam a gelificação das proteínas do soro do leite.....	4
1.1.4.1. Aquecimento.....	4
1.1.4.2. Concentração e estrutura das proteínas	5
1.1.4.3. pH e força iónica.....	6
1.1.4.4. Presença de outros co-solutos.....	7
 1.2. Influência de polissacarídeos na gelificação das proteínas do soro do leite	 8
1.2.1. Introdução	8
1.2.2. Propriedades funcionais de polissacarídeos nos alimentos	8
1.2.3. Interações polissacarídeos-proteínas.....	11
1.2.4. Gelificação de sistemas mistos proteínas do soro do leite-polissacarídeos.....	13

1.3. Reologia de biopolímeros.....	16
1.3.1. Introdução.....	16
1.3.2. Princípios teóricos e instrumentação.....	17
1.3.3. Propriedades reológicas de géis de proteínas.....	23
1.3.4. Propriedades reológicas de polissacarídeos	24
1.4. Microestrutura e microscopia de géis.....	27
1.4.1. Introdução.....	27
1.4.2. Microscopia Electrónica de Varrimento	28
1.4.3. Microscopia Confocal de Varrimento de Laser	28
CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1. Amostras	31
2.2. Preparação das amostras de polissacarídeos	31
2.2.1. Purificação das amostras comerciais.....	31
2.2.2. Modificação das galactomananas por acção enzimática	32
2.3. Preparação de soluções	34
2.3.1. Preparação de soluções de galactomananas	34
2.3.2. Preparação de dispersões de isolado de proteína de soro do leite	35
2.3.3. Preparação de misturas galactomanana/IPSL	35
2.4. Caracterização físico-química dos polissacarídeos	36
2.4.1. Humidade, cinzas e proteína	36
2.4.2. Açúcares neutros	36
2.4.3. Viscosidade Intrínseca/ Massa molecular viscosimétrica	38
2.5. Caracterização reológica	38
2.5.1. Equipamento.....	38
2.5.2. Métodos utilizados	40
2.5.2.1. Caracterização das soluções de polissacarídeos.....	40
2.5.2.2. Caracterização dos géis de IPSL e das misturas	40

2.6. Microscopia	41
2.6.1. Microscopia electrónica de varrimento	41
2.6.2. Microscopia Confocal de Varrimento de Laser.....	42
 CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
 3.1. Caracterização físico-química dos polissacarídeos.....	43
3.1.1. Humidade, cinzas e proteína.....	43
3.1.2. Razão manose/galactose	44
3.1.3. Viscosidade intrínseca e massa molecular viscosimétrica	45
 3.2. Caracterização reológica dos polissacarídeos	46
3.2.1. Ensaio de escoamento	46
3.2.2. Ensaio de oscilação	50
 3.3. Gelificação do IPSL	51
3.3.1. Determinação da concentração mínima aproximada de gelificação do IPSL	51
3.3.2. Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear	52
3.3.3. Ensaio isotérmico	53
3.3.4. Ensaio não - isotérmico	57
3.3.5. Conclusões.....	59
 3.4. Efeito das galactomananas na gelificação dos IPSL.....	59
3.4.1. Introdução.....	59
3.4.2. Efeito da galactomanana a pH 7	60
3.4.2.1. Ensaio reológico	60
3.4.2.2. Microscopia confocal de varrimento laser.....	66
3.4.3. Efeito da galactomanana a pH 5	67
3.4.3.1. Ensaio reológico	67
3.4.3.2. Microscopia electrónica de varrimento	70
3.4.4. Conclusões.....	72
 3.5. Efeito do grau de ramificação das galactomananas na gelificação dos IPSL a pH 7.....	73
3.5.1. Introdução	73

3.5.2. Comportamento viscoelástico durante a formação do gel	74
3.5.3. Comportamento viscoelástico dos géis formados	76
3.5.4. Microscopia Confocal de Varrimento Laser	78
3.5.5. Conclusões	80
Referências	81

Lista de abreviaturas e símbolos

BSA	Albumina do soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
α -la	α -lactalbumina
β -lg	β -lactoglobulina
C	Concentração
CLSM	Microscopia confocal de varrimento de laser (do inglês <i>confocal laser scanning microscopy</i>)
CPSL	Concentrado de proteína do soro do leite
eq.	equação
G*	Módulo complexo
G''	Módulo de perda
G'	Módulo de conservação
GA	Goma de alfarroba
GAc	Goma de alfarroba comercial
GApur	Goma de alfarroba purificada
gal	Galactose
GG	Goma de guar
GGcom	Goma de guar comercial
GGpur	Goma de guar purificada
glc	Glucose
GT	Goma de tara
GTcom	Goma de tara comercial
GTpur	Goma de tara purificada
HMDS	Hexa-metil-dissilano
IPSL	Isolado de proteínas do soro do leite
k'	Constante de Huggins (eq. 14)
k''	Constante de Kraemer (equação 15)
M	Torque
man	Manose
man/gal	Razão manose/galactose

pI	Ponto isoelétrico
PSL	Proteínas do soro do leite
R	Raio do cone (reologia)
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (do inglês <i>electron scanning microscopy</i>)
r.p.m.	Rotações por minuto
Tan δ	Tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta = G''/G'$)
δ	Ângulo de perda
δ_0	Amplitude da deformação
$\dot{\gamma}$	Taxa de corte
ω	Frequência de oscilação angular (rad/s)
ν	Frequência de oscilação (Hz)
γ	Deformação
σ	Tensão de corte
a	Ângulo do cone
α	$\alpha = \text{galactose}/(\text{manose} + \text{galactose})$
σ_0	Amplitude da tensão
η_r	Viscosidade relativa
η_{esp}	Viscosidade específica
$[\eta]$	Viscosidade intrínseca (dL/g)

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição proteica do soro de leite bovino	2
Tabela 2 - Aplicações de alguns polissacarídeos utilizados na indústria alimentar	9
Tabela 3 - Composição das sementes (em % peso seco).....	10
Tabela 4 - Teores de proteína, cinzas e humidade para as amostras comerciais e purificadas das gomas de alfarroba, guar e tara (os valores apresentados correspondem à média de dois ensaios).	43
Tabela 5 - Razões manose/galactose, viscosidades intrínsecas $[\eta]$ e massas moleculares viscosimétricas das amostras de galactomananas	45

Índice de figuras

Figura 1 – Etapas de gelificação de proteínas globulares induzidas por aumento da temperatura.....	4
Figura 2 - Esquema do comportamento geral das misturas proteína/polissacarídeo	12
Figura 3 – Experiência dinâmica que mostra a resposta dos materiais de acordo com o seu carácter viscoelástico (--- tensão, — deformação).....	18
Figura 4 – Esquema representativo do sistema de medição cone-placa	21
Figura 5 - Esquema representativo do sistema de medição placa-placa.	21
Figura 6 - Comportamento reológico das soluções de biopolímeros	25
Figura 7 – Razões manose/galactose em função do tempo de hidrólise com α -galactosidase (0,08 U/mL, 40 °C, pH 5): (A) galactomanana 1 g/L; (B) galactomanana 5 g/L.	33
Figura 8 - Esquema do procedimento sequencial para a obtenção das amostras de galactomananas.	34
Figura 9 - Reómetro <i>Bohlin CVO 120 HR</i>	39
Figura 10 - Reómetro <i>TA Instruments AR-1000</i>	39
Figura 11 – Curvas de escoamento (viscosidade aparente em função da taxa de deformação) para soluções de amostras de (A) GG0H; (B) GG6H; (C) GG12H; (D) GA0H; (E) GA3H e (F) GT0H com as concentrações 0,2 g/dL (símbolos abertos) e 0,8 g/dL (símbolos a cheio).....	47
Figura 12 - Aplicação do modelo de Cross (—) ao ensaio de escoamento para uma solução de GT0H 1 g/dL	48
Figura 13 - Curva Mestra ($\log C[\eta]$ em função de $\log \eta_{\text{esp}}$) para várias amostras de galactomananas	49
Figura 14 - Espectros mecânicos das amostras de galactomananas, 0,8 g/dL a 25°C (G' símbolos fechados e linha a cheio; G'' símbolos abertos e linha tracejada).....	51
Figura 15 - Géis de IPSL a diferentes pH	52
Figura 16 – Módulo de conservação reduzido (G'/G'_0) em função da deformação para os géis de IPSL (proteína 13 g/dL), a 20°C, e frequência 5 rad/s: (■) pH 7; (□) pH 5. G'_0 é o módulo de conservação no início do ensaio de varrimento de tensão.....	53

Figura 17 - Cinéticas de maturação dos géis de IPSL (proteína 13 g/dL) a pH5 (símbolos abertos) e pH 7 (símbolos a cheio) a 80°C, seguido de 20°C (5 rad/s): (■, □) $G'(t)$ e (▲, △) $\tan \delta$	54
Figura 18 - Espectros mecânicos das amostras IPSL, com diferentes concentrações de proteína, obtidos no final das cinéticas a 80°C e 20°C. (A) pH 5, proteína 5 g/dL; (B) pH5, proteína 13 g/dL ; (C) pH 7, proteína 13 g/dL; (D) pH 7, proteína 18 g/dL (G' - símbolos fechados e G'' - símbolos abertos).....	56
Figura 19 - Influência da concentração de proteína no módulo de conservação para dois sistemas de IPSL a diferentes pH. Os valores foram obtidos num ensaio de varrimento em frequência a 80°C, após uma cinética de 3 H a 80°C.....	57
Figura 20 - Módulo de conservação (G') em função da temperatura para os sistemas de IPSL (proteína 13 g/dL); (■) pH 7 e (□) pH 5.....	57
Figura 21 - Evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura, de dispersões de IPSL para várias concentrações de proteína: (A) pH7; (B) pH5.	58
Figura 22 - Dependência da temperatura do módulo de conservação - G' (símbolos a cheio) e do módulo de perda - G'' (símbolos abertos) dos sistemas IPSL + GApur (A - proteína 11 g/dL, B - proteína 13 g/dL) a pH 7, aquecidos de 40 a 90°C (5 rad/s, 1°C/min).....	61
Figura 23 - Espectros mecânicos para sistemas de IPSL, proteína 11 g/dL (A) e 13 g/dL (B) + GApur, a pH7, obtidos a 20°C após as experiências não isotérmicas.....	62
Figura 24 - Variação do módulo de conservação (símbolos a cheio) e da tangente ao ângulo de perda (símbolos abertos) durante as experiências de cura a 80°C para sistemas IPSL (proteína 11 g/dL) + GApur, a pH7: (A) GApur 0 g/L; (B) GApur 0,25 g/dL; (C) GApur 0,41 g/dL	63
Figura 25 - Variação do módulo de conservação (símbolos a cheio) e da tangente ao ângulo de perda (símbolos abertos) durante as experiências de cura a 80°C para sistemas IPSL (proteína 13 g/dL) + GApur, a pH7.	64
Figura 26 - Espectros mecânicos para sistemas de IPSL, proteína 11 g/dL (A) e 13 g/dL (B) + GApur, a pH7, obtidos a 20°C após as experiências não isotérmicas (G' símbolos a cheio; G'' símbolos abertos)	65
Figura 27 - Imagens de CLSM para IPSL com 13 g/dL de proteína (A); sem galactomanana; (B) IPSL + 0,2 g/dL de GA e (C) IPSL + 0,8 g/dL de GA	66

Figura 28 - Dependência da temperatura do módulo elástico- G' (símbolos a cheio) e do módulo viscoso- G'' (símbolos abertos) dos sistemas IPSL + GApur (A - proteína 5 g/dL, B – proteína 13 g/dL), a pH 5, aquecidos de 40 a 90°C (5 rad/s, 1°C/min).....	68
Figura 29 - Variações iniciais nos módulos viscoelásticos (G' -símbolos a cheio e G'' -símbolos abertos) durante as experiências de cura a 80°C para os sistemas IPSL+GApur (A – proteína 5g/dL, B - proteína 10 g/dL, C - proteína 13 g/dL), a pH 5.....	69
Figura 30 - Espectros mecânicos para sistemas de IPSL + GApur a pH5, obtidos após uma cinética a 80°C (coluna da esquerda) e uma cinética a 20°C (coluna da direita): módulo de conservação – símbolos a cheio; módulo de perda – símbolos abertos. ...	70
Figura 31 - Imagens de SEM de géis de IPSL, proteína 8 g/dL a pH5: (A) sem galactomanana; (B) GA0H 0,1 g/dL; (C) GA0H 0,2 g/dL e (D) GA0H 0,4 g/dL (ampliação x2000).....	71
Figura 32 - Imagens de SEM do gel de IPSL, proteína 8 g/dL + GA0H 0,4 g/dL a pH5 (ampliação x10000).....	72
Figura 33 - Evolução dos módulos viscoelásticos (G' - símbolos cheios e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada) em função da temperatura para sistemas de IPSL/galactomanana (concentração de proteína de 13 g/dL), a pH 7: (A) 0,2 g/dL de galactomanana; (B) 0,6 g/dL de galactomanana.	74
Figura 34 - Evolução dos módulos viscoelásticos (G' - símbolos cheios e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada) em função da temperatura para sistemas de IPSL/goma de guar (concentração de proteína de 13 g/dL), a pH 7: (A) 0,2 g/dL de guar; (B) 0,6 g/dL de guar.....	75
Figura 35 – Temperaturas de gelificação para os sistemas IPSL/galactomanana (concentração de proteína 13 g/dL, pH 7).....	76
Figura 36 – Espectros mecânicos (G' - símbolos cheios e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada), a 20 °C, dos sistemas de IPSL/galactomanana (concentração de proteína de 13 g/dL), a pH 7: (A) 0,2 g/dL de galactomanana; (B) 0,6 g/dL de galactomanana.....	77
Figura 37 - Evolução dos módulos viscoelásticos (G' - símbolos cheios e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada), a 20 °C, dos sistemas IPSL/goma de guar	

(concentração de proteína de 13 g/dL), a pH 7: (A) 0,2 g/dL de guar; (B) 0,6 g/dL de guar.....	77
Figura 38 – Imagens CLSM de géis de IPSL 13 g/dL, corados com <i>Rodamina B</i> . (A) sem galactomanana; (B) GG0H 0,2 g/dL; (C) GT0H 0,2 g/dL e (D) GA0H 0,2 g/dL.....	78
Figura 39 - Imagens CLSM de géis de IPSL 13 g/dL, corados com <i>Rodamina B</i> . (A) 0,6 g/dL GG0H; (B) 0,6 gd/L GT0H e (C)0, 6 g/dL GA0H	79
Figura 40 - Imagens CLSM de géis de IPSL 13 g/dL, corados com <i>Rodamina B</i> . (A) 0,2 g/dL GG6H; (B) 0,2 g/dL GG12H; (C) 0,6 g/dL GG6H e (D) 0,6 g/dL GG12H	80

Introdução Geral

As proteínas e os polissacarídeos são componentes importantes e abundantes nos alimentos, quer pelo seu valor nutricional como também pelas suas propriedades funcionais, particularmente no que respeita à sua influência na textura dos alimentos. Estes biopolímeros são moléculas de elevada complexidade que interactivam no meio em que se inserem. Esta interacção depende das características das próprias macromoléculas e do meio envolvente e tem grande influência nas propriedades finais exibidas pelos produtos em que estão incluídas.

Um dos objectivos principais do presente trabalho foi o estudo do efeito da adição de polissacarídeos neutros, em particular de galactomananas, na gelificação das proteínas do soro do leite. O que motivou em primeiro lugar este estudo foi o facto de tanto as proteínas do soro do leite como as galactomananas serem ingredientes e/ou aditivos muito utilizados na indústria alimentar como agentes emulsionantes, gelificantes, espessantes e estabilizantes.

O trabalho apresentado inseriu-se no projecto “Aspectos Estruturais e Funcionais das Interações Polissacarídeos – Proteínas em Alimentos Coloidais” – financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (POCTI/33626/BIO/99-00), que teve como objectivo geral contribuir para o conhecimento fundamental da influência de polissacarídeos na funcionalidade de proteínas em formulações alimentares coloidais.

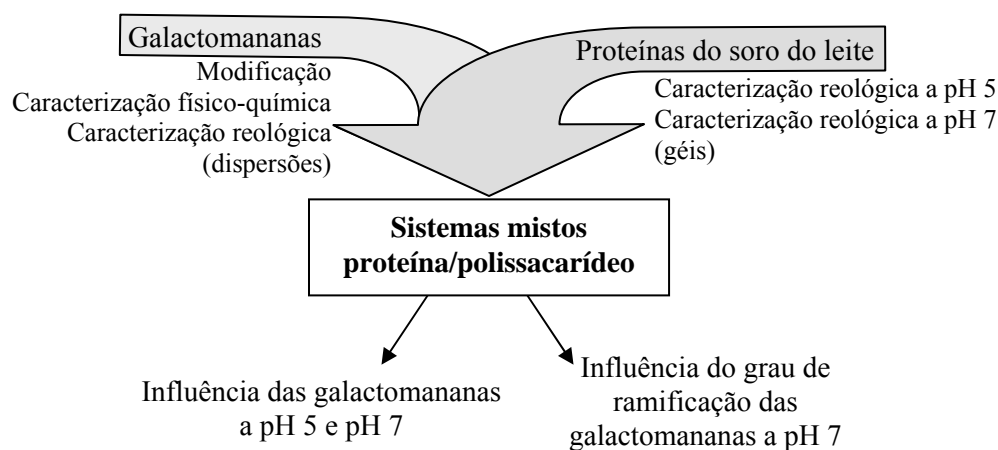
As técnicas experimentais utilizadas incluíram, essencialmente, métodos reológicos e microscópicos. A reologia é útil para estudar as propriedades gelificantes das macromoléculas, nomeadamente o comportamento viscoelástico durante e após a formação de um gel, e relacioná-las com as características desses polímeros tais como a sua estrutura, tamanho e conformação, e também com as interacções entre macromoléculas e entre estas e o solvente. Assim, este trabalho incidiu grandemente na análise reológica dos biopolímeros, utilizando métodos reológicos fundamentais não-destrutivos. A microestrutura dos géis obtidos foi também analisada, nomeadamente por microscopia electrónica de varrimento e microscopia confocal de varrimento de laser, para

complementar o estudo reológico com informação microestrutural sobre os sistemas mistos proteína/polissacarídeos estudados.

As amostras de galactomananas estudadas incluíram as gomas de alfarroba, guar e tara, originais e modificadas por acção da α -galactosidase e um isolado de proteína do soro do leite.

O trabalho iniciou-se com a purificação das farinhas comerciais de alfarroba, guar e tara e modificação por acção enzimática das respectivas gomas purificadas, de forma a obter galactomananas com diversos graus de ramificação. De seguida procedeu-se ao estudo das propriedades físico-químicas e caracterização reológica das amostras de galactomananas obtidas. Depois procedeu-se à caracterização reológica, nomeadamente o estudo das propriedades dinâmicas viscoelásticas, do isolado de proteína do soro do leite em dois sistemas com características muito distintas – um a pH próximo do ponto isoeléctrico destas proteínas e outro o a pH neutro.

O passo seguinte foi estudar a influência da goma de alfarroba purificada nas propriedades reológicas e microestruturais do isolado de proteína do soro do leite para os mesmos dois sistemas e finalmente investigou-se a influência do grau de ramificação das galactomananas nestas mesmas propriedades, para o sistema proteico a pH neutro.



Capítulo 1 - Revisão de Assuntos

1.1. Gelificação das proteínas do soro do leite

1.1.1. Introdução

Nos últimos cinco anos da década de 1980 a produção anual de concentrado de proteína do soro do leite (CPSL) nos Estados Unidos da América aumentou de 2300 para 45000 toneladas (Morr, 1989). Em 1990 a indústria alimentar norte-americana produziu aproximadamente 79600 toneladas de concentrado de proteína do soro do leite (Morr, 1992). Estes números reflectem a importância que as proteínas do soro do leite (PSL) ganharam nas últimas décadas do século XX. De entre os factores responsáveis pelo aumento da produção de CPSL destacam-se a maior economia em recuperar o soro do leite em relação ao seu desperdício, um melhoramento nas tecnologias de concentração e fraccionamento e o desenvolvimento de uma estratégia de publicidade em relação à composição e propriedades funcionais deste produto que atraiu os consumidores.

A gelificação é uma propriedade proteica muito importante pois tem grande influência na textura dos produtos alimentares, o que está directamente relacionado com a percepção por parte do consumidor. Os mecanismos de gelificação das proteínas globulares, entre as quais as proteínas do soro do leite, são estudados há várias décadas. Em particular os mecanismos de gelificação induzidos por calor são razoavelmente entendidos e consensuais, embora a sua investigação continue actualmente de modo a alcançar um conhecimento mais detalhado e quantitativo.

Sendo a β -lactoglobulina (β -lg) a proteína mais abundante no soro do leite, as suas propriedades funcionais determinam as propriedades funcionais dos concentrados e isolados do soro do leite. Assim, o estudo das propriedades gelificantes da β -lg contribui grandemente para a compreensão da gelificação dos concentrados e isolados como um todo.

1.1.2. Constituição e características do soro do leite

O soro do leite é um subproduto do fabrico de queijo ou da extracção da caseína e contém cerca de metade dos sólidos presentes no leite incluindo 20% das proteínas, lactose, sais minerais, vitaminas hidrossolúveis e alguma gordura.

As proteínas do soro do leite possuem um elevado valor nutricional, devido ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais e apresentam conformações globulares compactas que lhes conferem propriedades funcionais próprias (de Wit, 1989; Bottomley *et al.*, 1990). A Tabela 1 lista as proteínas presentes no soro do leite e algumas das suas características. Nesta tabela pode-se constatar que a proteína mais abundante no soro do leite é β -lactoglobulina (β -lg), seguindo-se a α -lactalbumina (α -la).

Tabela 1 - Composição proteica do soro de leite bovino

<i>Proteína</i>	<i>Concentração aproximada no soro (g/L)</i>	<i>Massa molecular (Dalton)</i>	<i>Ponto isoeléctrico</i>	<i>Percentagem aproximada do total de proteína</i>
β -Lactoglobulina	3,0	18 363	5,35-5,49	50
α -Lactalbumina	0,7	14 175	4,2-4,5	12
Imunoglobulinas	0,6	(1,61-10) $\times 10^6$	5,5-8,3	10
Albumina do soro bovino	0,3	66 267	5,13	5
Outras	1,4	4 100 - 40 800	3,3-3,7	23

Adaptado de Bottomley *et al.*, 1990

1.1.3. Mecanismo de gelificação de proteínas globulares

“A gelificação é um fenómeno de agregação de proteínas em que as interacções polímero-polímero e polímero-solvente estão tão balanceadas que é formada uma rede tri – dimensional capaz de imobilizar ou reter grandes quantidades de água, assim como de outros componentes” (Schmidt, 1981)

A gelificação induzida termicamente ocorre quando o desdobramento restrito da proteína dá origem a segmentos polipeptídicos capazes de interacções específicas que levam à formação de um gel (Aguilera, 1995).

Do ponto de vista científico o fenómeno da gelificação das proteínas globulares é razoavelmente entendido mas, mesmo hoje, detalhes importantes permanecem pouco claros, como os processos moleculares exactos que ocorrem durante a construção da rede e a melhor forma de descrever teoricamente estes processos (Clark *et al.*, 2001).

A gelificação das proteínas globulares induzida por calor é um processo que de acordo com Ferry *et al.* (1948) envolve dois passos:

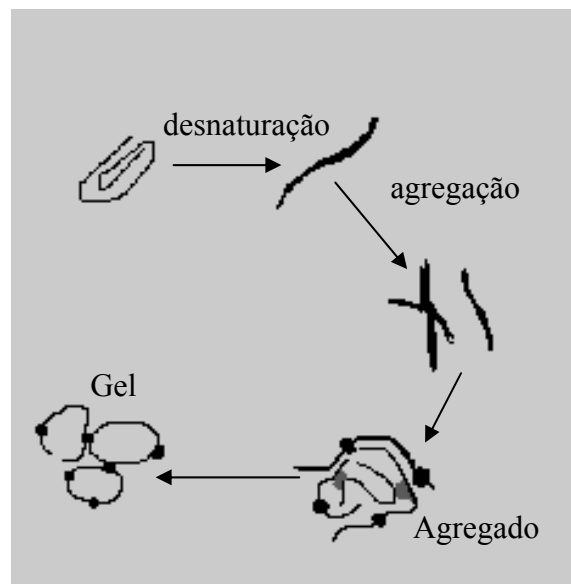
1. Desdobramento parcial
2. Agregação

Shmidt (1981) descreveu o processo de gelificação como ocorrendo em quatro fases principais (Figura 1):

1. Desnaturação da proteína nativa
2. Agregação das moléculas desdobradas
3. Ligação entre agregados
4. Associação de aglomerados e formação da rede

Na agregação da β -lg induzida por calor estão envolvidas alterações intra e intermoleculares. A pH neutro e à temperatura ambiente a β -lg existe como dímero. Quando se aquece acima dos 70°C a este pH e baixa força iónica a desnaturação e agregação da β -lg dá-se através de vários passos consecutivos baseados em reacções de troca entre grupos tiol e pontes dissulfureto. Este mecanismo tem início com a dissociação do dímero seguindo-se alterações na conformação da molécula que fica com os grupos hidrófobos e os grupos sulfidrilo livres expostos tornando-se reactivos. Estes ligam-se formando dímeros e posteriormente oligómeros e agregados maiores (Hoffmann e van Mil 1997; Roefs, 1994).

Para além do processo térmico existem outros processos de gelificação das PSL como por exemplo através da adição de agentes desnaturantes, como ureia e álcoois, neste caso ocorrendo a gelificação à temperatura ambiente. A gelificação a frio pode ser conseguida por formação de agregados por aquecimento, durante um determinado período de tempo, seguindo-se uma alteração da qualidade do solvente por diminuição de pH ou pela adição de sais de cálcio ou sódio (Alting *et al.*, 2002; Bryant e McClements, 1998).



Adaptado de Aguilera, 1995

Figura 1 – Etapas de gelificação de proteínas globulares induzidas por aumento da temperatura

1.1.4. Factores que influenciam a gelificação das proteínas do soro do leite

De entre os vários factores que afectam as propriedades das proteínas do soro do leite destacam-se:

- A temperatura
- A concentração de proteína
- O pH
- A força iónica do meio
- A presença de outros co-solutos

1.1.4.1. Aquecimento

A temperatura de aquecimento influencia a gelificação das PSL. Um aumento da temperatura até aproximadamente 60°C provoca alterações reversíveis na estrutura proteica. Temperaturas superiores levam à desnaturação proteica e, consequentemente, a alterações irreversíveis. As PSL gelificam a uma temperatura pouco inferior a 80°C.

Sabe-se que ao aquecer a β -lactoglobulina esta dissocia-se, passando de dímero a monómero, expondo os seus grupos tiol e resíduos hidrófobos interiores permitindo reacções de troca tiol/dissulfureto (Kazmierski e Corredig, 2003).

A velocidade de aquecimento também tem influência na gelificação das PSL. Stading *et al.* (1993) demonstraram este facto para géis de β -lactoglobulina, mais concretamente no que respeita à influência da velocidade de aquecimento no tamanho dos agregados e poros (§1.4.1).

1.1.4.2. Concentração e estrutura das proteínas

O principal componente proteico do soro do leite é a β -lg e é a capacidade gelificante desta proteína que mais contribui para a gelificação dos preparados de soro do leite. O conteúdo em β -lg destes preparados está relacionado com a força do gel, enquanto que esta não parece ter relação com o conteúdo em α -la (Zayas, 1997). No entanto, as misturas de α -la com β -lg dão origem a géis mais firmes, comparando com a β -lg sozinha, evidenciando um comportamento sinérgico da fracção α , embora pareça existir uma concentração máxima de α -la para a qual este efeito se verifica (Rojas *et al.* 1997).

Os estudos de Gezimati e colaboradores (1997) e de Schokker e colaboradores (2000) revelaram que o mecanismo de agregação de misturas de β -lg/ α -la é governado essencialmente pela β -lg, embora a presença de α -la tenha influência no tamanho dos agregados, diminuindo a proporção de agregados pequenos. Concluiu-se que a adição da α -la antes do aquecimento afecta o passo de agregação ao privilegiar os agregados formados por ligações dissulfureto (em detrimento daqueles formados por ligações hidrofóbicas), mas não altera a velocidade inicial de desnaturação da β -lg.

A albumina do soro bovino (BSA) também tem influência na gelificação de misturas com a β -lg, pois influencia a perda da estrutura nativa por parte desta aquando do aquecimento, ao mesmo tempo que a β -lg tem influência semelhante na BSA. Constatou-se que a pH 7 a firmeza dos géis formados pelas duas proteínas é menor do que a firmeza de géis de BSA sozinha e maior do que a dos géis de β -lg (Hines e Foegeding, 1993; Matsudomi *et al.*, 1994; Gezimati *et al.*, 1997).

As numerosas ligações hidrofóbicas e dissulfureto entre as moléculas de proteína, a concentrações elevadas, podem compensar as forças electrostáticas repulsivas associadas ao pH afastado do ponto isoeléctrico (pI). O aumento da concentração de proteína aumenta a firmeza dos géis, aumenta a sua capacidade de retenção de água e diminui a sua transmitância (Shimada e Cheftel, 1988). O mecanismo de gelificação sugere que as reacções de polimerização das proteínas levam à formação de ligações covalentes

compostas por pontes dissulfureto, e outras ligações não-covalentes como interações hidrofóbicas e iónicas que contribuem para a formação dos agregados (Zayas, 1997; Manguino, 1992). Segundo Hegg (1982), a distribuição dos aminoácidos apolares ao longo da cadeia contribui mais para o desenvolvimento de interações intermoleculares do que o conteúdo total em aminoácidos.

A concentração mínima para a gelificação das proteínas depende de vários factores. O aumento da força iónica e a proximidade ao pI faz diminuir a concentração mínima para a gelificação das PSL (Stading e Hermanson., 1990).

1.1.4.3. pH e força iónica

O aquecimento das proteínas provoca a sua desnaturação e agregação sendo este passo muito sensível ao pH e à presença de iões no meio, devido à exposição dos grupos tiol e das superfícies hidrofóbicas que ocorre com o desenrolamento da proteína.

Para valores próximos do pI são potenciadas as interações proteína-proteína pois a este pH a carga total da proteína é nula, sendo favorecidas as interações hidrofóbicas, enquanto que as repulsões electrostáticas são reduzidas, favorecendo a agregação do biopolímero, o que dá origem as géis com estrutura granulosa de aspecto opaco (Langton & Hermanson, 1992; Aguilera, 1995).

A pH neutro e baixa força iónica, as proteínas estão electricamente carregadas e muito estendidas, ocorrendo ligações de hidrogénio entre as cadeias polipeptídicas (Lefebvre e Subirade, 2000) o que leva à formação dos géis transparentes (Langton e Hermanson, 1992). Os géis formados para $\text{pH} < \text{pI}$ são menos firmes que para $\text{pH} > \text{pI}$ e requerem temperaturas mais altas para se formarem (Boye *et al.*, 1995).

A pH 7,5 a β -lg sofre uma alteração na conformação acompanhada por uma expansão molecular. Acima de pH 7 há um aumento rápido da reactividade dos grupos tiol e nessa região ocorre a dissociação do dímero, tornando-se a proteína instável para valores de pH iguais ou acima de 8, pois há formação de agregados de proteína desnaturada (Lyster, 1972). A pH básico a polimerização ocorre predominantemente através de reacções que envolvem a oxidação de grupos tiol, enquanto que a pH ácido prevalecem reacções de conversão tiol/dissulfureto (Monahan *et al.*, 1995).

A força iónica pode aumentar ou reduzir a incompatibilidade influenciando tanto a interacção electrostática entre as moléculas similares (proteína-proteína ou polissacarídeo-polissacarídeo) como entre moléculas diferentes (proteína-polissacarídeo) (Syrbe *et al.*,

1995). Em geral o aumento da força iónica resulta em géis menos homogéneos. Quanto mais o pH se desviar do valor de pI mais abrangente é o domínio de concentração salina no qual os géis permanecem claros. Para pH superior a 7 a gelificação da β -lactoglobulina é grandemente favorecida pelo cloreto de cálcio e pelo cloreto de sódio (Mulvihill e Kinsella, 1988).

Quando ocorre a gelificação induzida por calor, à medida que a força iónica aumenta ou que o pH se aproxima do pI da proteína, as forças repulsivas vão-se tornando mais fracas e a proteína desnaturada agrega-se por interacções físicas como forças hidrofóbicas e interacções de van der Waals, aumentando a turbidez do gel.

Kuhn e Foegeding (1991) descreveram o efeito da adição de cloreto de cálcio e cloreto de sódio no aspecto e nas propriedades reológicas em condições de fractura de géis de IPSL. Estes autores concluíram que o efeito dos sais nas propriedades reológicas dos géis estava relacionado com a valência dos catiões e que eram significativas as diferenças no que respeita à força dos géis, significando que a carga do catião influencia grandemente a estrutura dos géis de PSL formados por aquecimento.

Em geral a adição de iões resulta em géis de IPSL ou CPSL mais firmes, no entanto os preparados comerciais podem responder de forma diferente às várias manipulações de pH e força iónica (Morr, 1992; Morr e Foegeding, 1990)

Renard e Lefebvre (1992), partindo de uma aproximação de Clark e Ross-Murphy relativa ao mecanismo de gelificação, aplicaram um modelo matemático para a determinação da concentração crítica para a gelificação da β -lactoglobulina em função da força iónica e pH do meio. Este modelo conseguiu explicar os dados experimentais obtidos por estes autores, excepto para forças iónicas muito altas ou muito baixas.

1.1.4.4. Presença de outros co-solutos

As características finais dos produtos alimentares que chegam ao consumidor são um somatório de todas as interacções existentes entre todos os ingredientes que constituem o alimento.

Lípidos, monossacarídeos, polissacarídeos e outros podem interferir na capacidade de gelificação das PSL. O efeito depende da composição relativa dos preparados de soro do leite e da natureza dos seus componentes (Morr, 1992).

Por exemplo, os lípidos presentes nos preparados de PSL podem inibir a gelificação ao interferir com a polimerização das proteínas por formação de ligações hidrofóbicas (Schmidt, 1981).

1.2. Influência de polissacarídeos na gelificação das proteínas do soro do leite

1.2.1. Introdução

Espessantes, estabilizantes e agentes gelificantes são ingredientes alimentares muito utilizados e que influenciam significativamente as propriedades de textura dos alimentos. A interação entre biopolímeros tem uma extrema importância nas propriedades macroscópicas finais dos produtos alimentares tais como a estabilidade, textura e sensação na boca. As proteínas e os polissacarídeos são duas das mais importantes classes de biopolímeros usados em alimentos pelas suas propriedades funcionais, que contribuem grandemente para as propriedades estruturais e de textura de colóides alimentares, através da sua capacidade de espessamento, gelificação e/ou actividade interfacial.

1.2.2. Propriedades funcionais de polissacarídeos nos alimentos

Os polissacarídeos, pela sua arquitectura molecular, o seu tamanho e as forças moleculares secundárias a que podem estar sujeitos, em particular ligações de hidrogénio, conferem aos sistemas alimentares propriedades funcionais extremamente interessantes. Para além de terem importância do ponto de vista nutricional, pois constituem uma fonte de fibra dietética, são largamente utilizados pelas propriedades espessantes ou gelificantes, contribuindo para a construção da textura dos produtos alimentares. A Tabela 2 mostra alguns dos polissacarídeos mais utilizados na indústria alimentar e as suas propriedades funcionais mais representativas.

No presente trabalho utilizaram-se como amostras de polissacarídeos as gomas de alfarroba, de guar e tara. Estas gomas, especialmente a de guar e alfarroba são largamente utilizadas na indústria alimentar devido às suas propriedades espessantes, pois têm a capacidade de formar soluções aquosas muito viscosas mesmo a baixas concentrações. Algumas combinações destes produtos com outros hidrocolóides podem resultar em propriedades funcionais muito interessantes, tanto na indústria alimentar como noutras áreas de aplicação (Dea e Morrison, 1975; Richardson *et al*, 1998; Pai & Khan, 2002).

Tabela 2 - Aplicações de alguns polissacarídeos utilizados na indústria alimentar

<i>Nome</i>	<i>Origem</i>	<i>Propriedades funcionais</i>	<i>Alimento</i>
Galactomananas	Plantas	Estabilizantes, espessantes, retenção de água	Gelados, queijo creme, sobremesas
Pectinas	Plantas	Gelificantes, espessantes, estabilizantes	Geleias, compotas, bebidas de fruta, produtos lácteos, confeitaria
Goma Xantana	Bactérias	Espessante, estabilizante, retenção de humidade	Geleias, bebidas de fruta, queijo creme,
Alginatos	Algas	Estabilizantes, gelificantes	Gelados, coberturas, cervejas, bebidas de frutas
Carrageninas	Algas	Estabilizantes, gelificantes, espessantes	Pudins, gelados, molhos para saladas, sobremesas

Adaptado de Trudso, 1991

A goma de alfarroba (GA) é uma mucilagem produzida a partir do endosperma da semente de alfarrobeira, *Ceratonia siliqua*, planta da família das Leguminosas originária dos países da Europa do Sul e Próximo Oriente, embora tenha sido exportada para muitas outras partes do mundo como os Estados Unidos da América e Austrália. A semente de alfarroba é, desde os tempos bíblicos, consumida como fonte de nutrientes por animais e humanos e também muito utilizada pelas suas propriedades funcionais – os egípcios utilizavam uma pasta de semente de alfarroba para colar as ligaduras às múmias. No entanto, a sua produção industrial iniciou-se nos princípios do século XX (Dea e Morrison, 1975).

A goma de guar tem a sua origem num arbusto, *Cyanopsis tetragonolobus*, nativo da Índia e Paquistão e introduzido nos Estados Unidos da América no princípio do século XX, tendo-se tornado de grande importância comercial durante a II Guerra Mundial, com a redução do fornecimento de goma de alfarroba vinda do Mediterrâneo (Dea e Morrison, 1975).

A goma de tara deriva do endosperma da planta de tara, *Caesalpinia spinosa*, da família das leguminosas *Caesalpinaceae*. A planta é cultivada comercialmente no Perú para consumo humano e animal.

Na Tabela 3 comparam-se as três gomas, alfarroba, guar e tara, no que respeita à composição das suas sementes.

Tabela 3 - Composição das sementes (em % peso seco)*

	<i>Casca</i>	<i>Endosperma</i>	<i>Embrião</i>
Guar	14-17	35-42	43-47
Alfarroba	30-33	42-46	23-25
Tara	39,5-41	25-27	25,5-27

*Deuel e Neukom, 1954; Panegassi, *et al.*, 2000

As gomas de alfarroba, guar e tara são constituídas maioritariamente por galactomananas - cadeias lineares de resíduos de β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranosilo parcialmente substituídos por resíduos terminais de α -D-galactopiranosilo ligados em 1 \rightarrow 6. As propriedades funcionais destes polissacarídeos dependem das suas características estruturais, como sejam o número e forma de distribuição dos monómeros de galactose ao longo da cadeia de manose e a sua massa molecular (Deuel e Neukom, 1954; Neukom, 1989).

Na goma de alfarroba existem em média quatro unidades de manose por cada unidade de galactose. A distribuição dos resíduos de galactose não é regular, apresentando-se maioritariamente em blocos, mas também distribuída ao acaso ou com alguma ordenação (Daas *et al.*, 2000). O polissacarídeo constituinte da goma de guar é semelhante ao da goma de alfarroba, diferindo apenas na razão de manose/galactose (man/gal) e na forma de distribuição das cadeias laterais. A razão man/gal é neste caso de cerca de 1,5 e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia de manana é essencialmente ao acaso (McCleary *et al.*, 1985; Daas *et al.*, 2000). No que respeita à goma de tara a galactomanana que a constitui tem uma razão man/gal de cerca de 3.

Devido às diferentes características estruturais, nomeadamente o diferente grau de ramificação, as galactomananas obtidas da alfarroba, guar e tara apresentam diferente solubilidade em água. A solubilidade da goma de tara é intermédia das restantes duas, sendo que a goma de alfarroba se dissolve a uma temperatura mais elevada que as restantes gomas (Neukom, 1989). A solubilidade depende essencialmente do conteúdo em galactose, como foi demonstrado através da remoção selectiva de unidades de galactose por α -galactosidase (McCleary, 1981). A cinética de dissolução das galactomananas, tal como

para outros materiais macromoleculares, depende também da massa molecular do polímero, como foi demonstrado para o guar (Wang *et al.*, 2003).

Um dos problemas que existe com as gomas existentes no mercado para aplicação em sistemas alimentares, é o facto de existir uma grande variabilidade na qualidade das várias marcas, o que influencia as suas propriedades funcionais. Uma forma de diminuir o problema é purificar os polissacarídeos comerciais. A purificação destes polissacarídeos reduz ou elimina o sabor indesejável de algumas gomas comerciais assim como clarifica as soluções destas gomas devido à eliminação das impurezas e enzimas (Lopes da Silva e Gonçalves, 1990).

1.2.3. Interações polissacarídeos-proteínas

A interacção entre biopolímeros tem uma influência directa nas propriedades macroscópicas dos produtos alimentares como a textura, a sensação bucal ou a estabilidade.

Os polissacarídeos e as proteínas são biopolímeros que muitas vezes se encontram juntos em alimentos. A interacção entre estes biopolímeros depende grandemente da estrutura molecular de cada um, bem como de outros factores externos à macromolécula, como a força iónica ou o pH do meio e a qualidade do solvente.

As forças atractivas ou repulsivas entre macromoléculas diferentes originam dois fenómenos opostos: incompatibilidade entre polímeros ou formação de complexos (Tolstoguzov, 2003). No primeiro caso as interações polímero-solvente são favorecidas em detrimento das interações entre polímeros correspondendo a um fenómeno de separação de fases segregativo ou de incompatibilidade termodinâmica, o que se traduz num parâmetro de interacção de Flory-Huggins (χ_{23}) positivo. No segundo caso, em que χ_{23} é negativo, ocorre uma separação de fases associativa em que são favorecidas as interações entre os dois tipos de polímeros (Doublier *et al.*, 2000).

A Figura 2 mostra um diagrama proposto por Kruif e Tuinier (2001) para descrever os possíveis resultados da mistura entre dois biopolímeros em solução.

Para concentrações suficientemente elevadas a situação mais comum nas misturas de biopolímeros é a segregação, em que predominam as interações entre cadeias de polímero da mesma espécie (Tolstoguzov, 1991). Para polímeros de forma e estrutura diferentes a segregação conduz a uma redução da concentração de um dos polímeros nas

proximidades do outro - depleção - devido a uma perda da entropia conformacional perto da interface. Ao ser excedida uma determinada concentração pode ocorrer então a separação de fases (de Kruif e Tuinier, 2001).

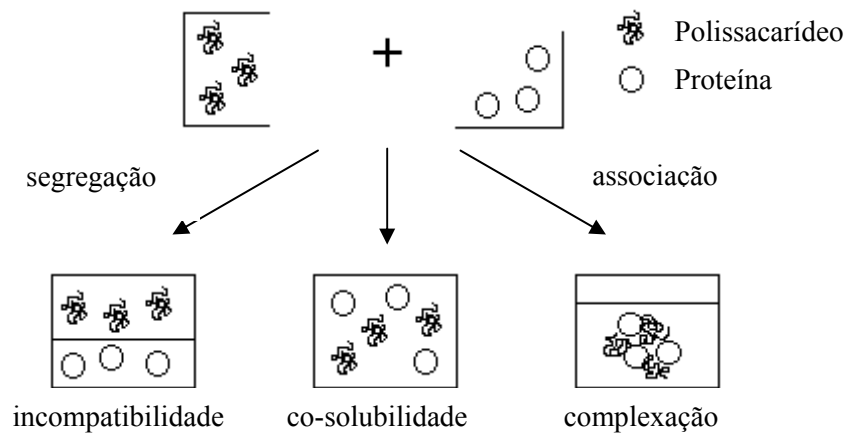


Figura 2 - Esquema do comportamento geral das misturas proteína/polissacarídeo

Uma mistura de proteínas e polissacarídeos pode também tornar-se instável quando existem interações associativas levando à coacervação complexa - o polissacarídeo adsorve na superfície de mais que uma molécula de proteínas começando a ligá-las entre si (de Kruif e Tuinier, 2001). Uma separação de fases associativa pode ocorrer, por exemplo, quando o polissacarídeo é aniônico, a um pH suficientemente alto para que o polissacarídeo esteja ionizado, mas abaixo ou ligeiramente acima do pI da proteína (Doublier *et al.*, 2000).

Quando a mistura é composta por um biopolímero gelificante e outro que não possui esta propriedade, existirá competição entre a gelificação e a separação de fases, levando a uma complexidade de microestruturas de gel que depende de um balanço entre as cinéticas dos dois processos (Doublier *et al.*, 2000; Tolstoguzov, 1998). Este balanço resulta num enorme manancial de propriedades finais dos produtos alimentares que incluem este tipo de ingredientes na sua composição.

No que respeita a misturas de proteínas com polissacarídeos neutros a compatibilidade termodinâmica diminui quando o pH se aproxima do pI da proteína e quando a massa molecular do polissacarídeo aumenta (Samant *et al.*, 1993).

A concentração e a massa molecular dos polissacarídeos são características importantes para o comportamento final das misturas proteína/polissacarídeo. A

diminuição da massa molecular do polissacarídeo resulta, em geral, num aumento da concentração necessária para obter a separação de fases nos sistemas mistos (Doublier *et al.*, 2000).

A baixa concentração, as cadeias individuais de polissacarídeo estão bem separadas e movem-se independentemente e assim a viscosidade é baixa. Com o aumento da concentração as cadeias começam a interpenetrar e provocam um aumento na viscosidade. Ao aumentar a concentração do polissacarídeo induz-se um impedimento estérico o que expulsa a pequena proteína globular da rede de polissacarídeo dando a esta a oportunidade de se agregar durante o aquecimento (Morris, 1995), favorecendo a separação de fases.

1.2.4. Gelificação de sistemas mistos proteínas do soro do leite-polissacarídeos

Os efeitos de um polissacarídeo na agregação e formação do gel numa mistura com PSL diferem, dependendo da natureza do polissacarídeo, do pH, da força iónica, da temperatura, do processamento e das concentrações usadas.

Foram já realizados diversos estudos sobre o efeito de diferentes polissacarídeos sobre as propriedades funcionais de PSL, com especial realce para os polissacarídeos iónicos. A influência de polissacarídeos como carrageninas, goma de guar, goma xantana ou alginatos na estabilidade térmica da β -lactoglobulina foi investigada, tendo-se verificado que esta está muito dependente do pH do meio (Baeza e Pilosof, 2002; Bryant e McClements, 2000; Weinbreck *et al.*, 2004). A análise de dados calorimétricos e cinéticos mostrou que a pH neutro os polissacarídeos aumentam a estabilidade térmica da β -lg devido a uma limitada incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros. A pH ligeiramente ácido este efeito é minimizado (Baeza e Pilosof, 2002).

Zhang e Foegeding (2003) estudaram misturas de β -lg com dextrana, sulfato de dextrana e carrageninas. Estes autores verificaram um aumento de turbidez das misturas com o aumento da razão polissacarídeo/proteína significando uma aceleração na formação dos agregados de β -lg. A presença de carga na cadeia do polissacarídeo teve, como esperado, um efeito decisivo na sua interacção com as proteínas. Os mesmos autores mostraram que, a pH neutro, o sulfato de dextrana a concentrações baixas estabilizava a β -lg face à agregação induzida por calor, enquanto que isto não acontecia com a dextrana não modificada. Dado que o primeiro é um análogo aniónico da dextrana crê-se que a capacidade estabilizante demonstrada por este se deva à presença dos grupos sulfato. A

partir de uma determinada concentração crítica de sulfato de dextrana passa a existir uma influência contrária por parte deste polissacarídeo. Os estudos destes autores suportaram também a observação de Bourriot e colaboradores (1999) no sentido de que a massa molecular do polissacarídeo tem influência na agregação da proteína.

O efeito das carrageninas depende da conformação destes polissacarídeos, o que influencia a maior ou menor exposição e proximidade dos grupos sulfato (em maior percentagem na λ -carragenina). Em geral, a adição de carrageninas influencia positivamente a formação de agregados proteicos, diminuindo a concentração crítica para a gelificação e aumentando a velocidade do processo, embora para determinadas condições, nomeadamente concentrações relativamente baixas em polissacarídeo, a λ -carragenina e a ι -carragenina tenham exibido um efeito inibitório na agregação da β -lg (Zhang e Foegeding, 2003; Baeza e Pilosof, 2002; Capron *et al.*, 1999, a e b; Eleya e Turgeon, 2000, a e b).

Syrbe e co-autores (1995) estudaram a incompatibilidade entre as proteínas do soro do leite e vários polissacarídeos. Estes autores verificaram que a pH 7 as misturas de PSL com arabinogalactana, dextrana e maltodextrina, aquecidas a 80°C, eram homogêneas e que, dentro das concentrações estudadas, a PSL desnaturada era incompatível com a metilcelulose, a carboximetilcelulose, a κ -carragenina e o guar.

A separação de fases tem impacto tanto na microestrutura como nas propriedades reológicas dos géis (Syrbe *et al.*, 1995). Verificou-se que nas misturas de PSL com guar ou com κ -carragenina havia um aumento rápido no módulo conservação (G') e a formação de pequenas esferas de polissacarídeo numa fase contínua de proteína. Isto significa que a adição daqueles polissacarídeos à proteína reforçou a sua estrutura de gel. No que respeita às misturas de metilcelulose, dextrana e maltodextrina, verificou-se que G' manteve-se muito abaixo, comparado com um gel só de proteína. Não se observou separação de fases para as misturas com dextrana e maltodextrina. A energia mecânica aplicada a um sistema de separação de fases pode modificar as propriedades reológicas e estruturais de uma mistura (Syrbe *et al.*, 1995; Manoj *et al.*, 1997).

No caso de misturas de pectinas e PSL verificou-se que o tipo e a proporção de pectina, assim como a concentração de cálcio afectam a dureza do gel. O aumento destes polissacarídeos fez aumentar a firmeza do gel (Beaulieu *et al.*, 2001). A influência de

polipectatos de sódio na gelificação da β -lg também depende grandemente da presença de íons cálcio e do pH do meio (Ndi *et al.*, 1996).

Em estudos efectuados com misturas de amido de milho e PSL verificou-se que havia um efeito sinérgico nas propriedades viscoelásticas dos géis a pH 9 enquanto que o efeito observado a pH 7 era apenas aditivo, sugerindo uma combinação química única entre os dois biopolímeros a pH 9 (Shim e Mulvaney, 2001). Em relação às amilopectinas, Olsson e co-autores (2000 e 2002) verificaram que estes polissacarídeos, mesmo a baixas concentrações, tinham influência no estado de agregação e nas propriedades viscoelásticas dos géis de β -lactoglobulina, sendo o efeito dependente das características da amilopectina utilizada (de baixa ou alta viscosidade).

O efeito de galactomananas como a goma de alfarroba na gelificação da β -lactoglobulina e da galactomanana da *Cassia javanica*, na gelificação de um IPSL é também conhecido. Verificou-se que a pH 7 a presença destes polissacarídeos aumentou a velocidade de agregação e a força do gel proteico e que este efeito está dependente das concentrações de galactomananas utilizadas (Gonçalves *et al.*, 2004, a e b).

O conhecimento sobre este tipo de sistemas tem grande importância para a engenharia alimentar, no sentido de ser uma base para o melhoramento de formulações alimentares e desenvolvimento de novos produtos. A presença de vários ingredientes nas formulações alimentares, desde componentes simples como sais, até componentes mais complexos como os polissacarídeos, tem grande influência nas propriedades funcionais das proteínas do soro do leite, nomeadamente na gelificação. Este facto tem como consequência uma diversidade de propriedades reológicas e microestruturais, que numa base sensorial se traduzem por texturas e percepções diferentes dos produtos alimentares e, numa análise final, na maior ou menor aceitação por parte dos consumidores.

1.3. Reologia de biopolímeros

1.3.1. Introdução

A reologia é a ciência que estuda as deformações e o escoamento da matéria, resultantes da aplicação de uma força. A palavra reologia deriva do grego *rhein* = escoamento + *logos* = ciência.

Todos os materiais têm propriedades reológicas e esta ciência tem aplicação nas mais diversas áreas do saber como a Geologia, Engenharia de Polímeros, Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia.

Os testes reológicos que se podem realizar para estudar produtos alimentares podem ser fundamentais, empíricos ou imitativos (Rao, 1986). Enquanto que os primeiros medem propriedades bem definidas, inerentes ao material e que não dependem da geometria utilizada, das condições empregues ou do aparelho, os restantes baseiam-se em parâmetros empíricos pouco definidos, mas úteis e práticos.

Na indústria alimentar as medições reológicas têm sido geralmente empíricas em detrimento dos métodos fundamentais que exigem equipamento mais sofisticado e operadores mais qualificados. Designadamente em Portugal, o conhecimento empírico ainda constitui a base de muitas empresas; no entanto a globalização dos mercados obriga a uma actualização tecnológica e um investimento das empresas na investigação, própria ou universitária, de forma a poderem elevar a sua qualidade e competitividade (Sousa, 2001).

Num teste empírico não são conhecidas as condições de tensão e deformação aplicadas na amostra, logo os resultados não podem ser expressos em parâmetros reológicos bem definidos como viscosidade e módulo conservação. Os testes empíricos têm a vantagem de serem fáceis de concretizar porque qualquer geometria de amostra pode ser utilizada (Mitchell, 1984). Neste trabalho serão abordados mais detalhadamente os testes fundamentais.

Algumas das áreas em que podem ser necessários e úteis os dados reológicos na indústria alimentar são as seguintes (Steffe, 1992; Sousa, 2001):

- a) Controlo de processo, envolvendo um grande número de equipamentos que podem medir em contínuo por exemplo a viscosidade;
- b) Determinação da funcionalidade de ingredientes durante o desenvolvimento de produtos;

- c) Controlo de qualidade do produto intermediário ou final;
- d) Durabilidade do produto;
- e) Avaliação da textura do produto por correlação com a análise sensorial;
- f) Análise das equações reológicas de estado ou constitutivas;
- g) Optimização de formulações por utilização de ferramentas estatísticas.

Nesta indústria, como noutros campos, perceber reologia é fundamental para otimizar o desenvolvimento de produtos, a metodologia de processamento e a qualidade final do produto.

1.3.2. Princípios teóricos e instrumentação

A reologia dedica-se à análise da deformação resultante da aplicação de uma tensão no material em estudo, ou vice-versa.

Os ensaios reológicos permitem aferir a variação da tensão e da deformação do material ao longo do tempo. De entre os testes fundamentais existem os ensaios quasi-estáticos, os ensaios transitórios e os ensaios dinâmicos. Nestes últimos é aplicada sobre a amostra uma deformação ou tensão que varia sinusoidalmente com o tempo, a uma determinada frequência angular ω , e regista-se a resposta da amostra, sendo esta também harmónica (Figura 3).

A diferença de fase entre a resposta e a solicitação é indicativa do carácter viscoso (líquido) ou sólido da amostra. Em geral o ângulo de fase δ situa-se entre os 0 e os 90°, tratando-se de uma amostra com carácter viscoelástico.

A razão entre a tensão e a deformação corresponde ao chamado módulo complexo que dá uma informação complexa sobre as propriedades viscoelásticas do material:

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \quad (1)$$

Sendo G^* o módulo complexo dependente da frequência de oscilação (ω), σ_0 a tensão e γ_0 a deformação.

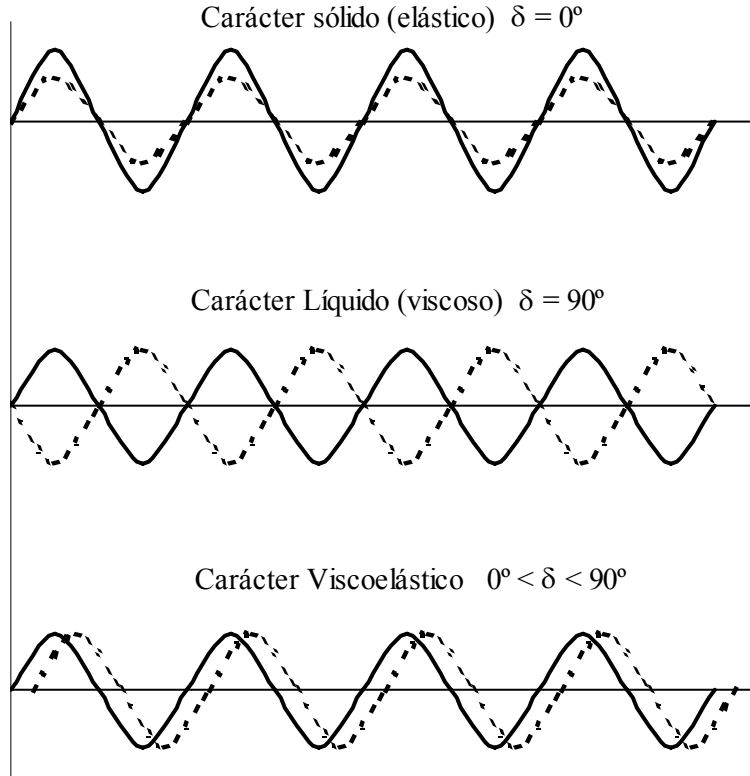


Figura 3 – Experiência dinâmica que mostra a resposta dos materiais de acordo com o seu carácter viscoelástico (--- tensão, — deformação).

O módulo complexo pode ainda definir-se como a soma complexa de dois parâmetros reológicos da seguinte forma:

$$G^* = G' + iG'' \quad (2)$$

onde o valor absoluto de G^* é dado por:

$$|G^*| = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \left[(G')^2 + (G'')^2 \right]^{1/2} \quad (3)$$

Os dois parâmetros $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ são os módulos de conservação (conservativo, elástico) e de perda (dissipativo, viscoso), respectivamente. Os nomes relacionam-se com o facto de o primeiro ser uma medida da energia que é armazenada por cada ciclo oscilatório, enquanto que o segundo mede a energia dissipada pela amostra (Mitchell, 1984). Para um material perfeitamente elástico (sólido de Hooke) a energia dissipada é zero estando a tensão e a deformação em fase ($\delta = 0^\circ$), enquanto que para um líquido perfeito (fluido de Newton) toda a energia é dissipada, sendo nulo o módulo de conservação ($\delta = 90^\circ$).

A tangente de perda ($\tan \delta$) é uma função de grande utilidade na caracterização reológica de um sistema pois relaciona-se com as propriedades físicas macroscópicas do material em estudo. Esta função relaciona a energia dissipada pelo sistema com a energia armazenada por este, relacionando os módulos de conservação e de perda da seguinte forma:

$$\tan \delta = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \quad (4)$$

A viscosidade complexa (η^*) é definida por:

$$\eta^* = \eta' - i\eta'' \quad (5)$$

estando a parte real (viscosidade dinâmica, η') e a parte imaginária relacionadas com os módulos viscoelásticos da seguinte forma:

$$G' = \omega \eta' \quad \text{e} \quad G'' = \omega \eta'' \quad (6)$$

Para fluidos newtonianos η' é a viscosidade newtoniana.

De entre os vários tipos de testes dinâmicos destacam-se os que foram realizados no presente estudo: testes de varrimento em tempo (estudos cinéticos) em que se determinam os módulos de conservação e perda para valores fixos de frequência e temperatura; testes de varrimento em temperatura, realizados também com uma frequência fixa; e testes de varrimento em frequência (espectros mecânicos) em que se determinam os módulos viscoelásticos em função da frequência mantendo a deformação e a temperatura.

Para a realização dos testes fundamentais dinâmicos utilizam-se reómetros, aparelhos actualmente bastante sofisticados e associados a programas computacionais que permitem a obtenção rápida de dados reológicos.

Basicamente num reómetro mede-se uma força (torque) aplicada sobre a amostra e a deformação sentida por esta. Então a razão força/deformação é convertida numa razão tensão/deformação usando um factor apropriado para a geometria utilizada no ensaio (Mitchell, 1984). Este factor é normalmente calculado para o comportamento linear (em que a tensão é directamente proporcional à deformação) pelo que os ensaios devem ser realizados dentro da gama de valores de comportamento linear previamente testados para a amostra em estudo. Para além, disso a conversão da razão força/deformação em

tensão/deformação através do factor teórico só deve ser feita em condições de inércia negligenciável.

Os ensaios dinâmicos, de grande utilidade no estudo de géis, são métodos não-destrutivos em que são aplicadas tensões tangenciais à amostra (tensões de corte) ou deformações muito reduzidas, não alterando as propriedades do material em estudo.

No presente estudo foram utilizados reómetros de tensão controlada. Estes reómetros são constituídos por uma parte móvel sustentada por uma almofada de ar para reduzir a inércia dos componentes do aparelho, e uma parte fixa.

À parte móvel do reómetro podem ser acopladas diversas geometrias, desde cones de diferentes diâmetros e ângulos a diversas placas lisas ou rugosas. A parte fixa do aparelho é constituída por uma placa circular lisa à qual está acoplado um sistema *Peltier* de controlo de temperatura. É nesta placa que são colocadas as amostras a analisar. No presente estudo foram utilizadas as geometrias cone-placa e placa-placa, em aço inoxidável, descritas a seguir.

A geometria cone-placa (Figura 4) é muito utilizada (desde os anos 1930) e permite a realização de inúmeros ensaios quer a baixas quer a altas taxas de deformação. A grande vantagem desta geometria é que se o ângulo do cone (α) for inferior a 4° e se a inércia do fluido puder ser desprezada (o que acontece para baixas velocidades de rotação) então a taxa de deformação na amostra ($\dot{\gamma}$), dependente do torque necessário para rodar o cone e da velocidade angular, é homogénea e pode ser calculada através da expressão:

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega}{a} \quad (7)$$

A tensão de corte (σ) é aproximadamente constante em todo o fluido e é dada por:

$$\sigma = \frac{3M}{2\pi R^3} \quad (8)$$

onde R é o raio do cone e M o torque aplicado na amostra (Mitchell, 1984).

A geometria cone-placa é particularmente útil para o estudo de sistemas fluidos homogéneos ou sistemas com partículas de dimensões muito reduzidas (inferiores a $1 \mu\text{m}$) pois a truncamento (T) tem também dimensões muito reduzidas.

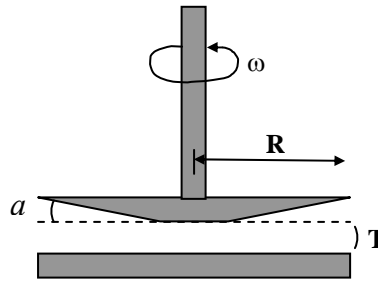


Figura 4 – Esquema representativo do sistema de medição cone-placa

Na geometria placa-placa (Figura 5) a deformação não é homogênea, o que constitui uma desvantagem, sendo o material sujeito a deformação máxima na periferia. Assumindo as mesmas simplificações que para a geometria cone-placa, a tensão e a taxa de corte são dadas pelas seguintes equações (Covas e Maia, 2001):

$$\sigma = \frac{M}{2\pi R^3} \left(3 + \frac{d \ln M}{d \ln \gamma_R} \right) \quad (9)$$

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega R}{a} \quad (10)$$

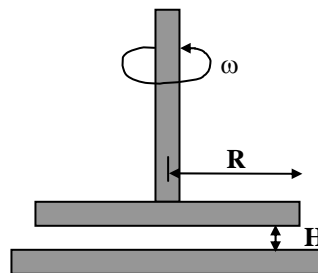


Figura 5 - Esquema representativo do sistema de medição placa-placa.

A amostra é introduzida entre a placa inferior e a placa superior que durante o ensaio fica à distância H (*gap*) da primeira. Em geral o tamanho das partículas da amostra deve ser pelo menos dez vezes inferior ao *gap*.

A geometria placa-placa é habitualmente utilizada em ensaios onde se pretendem estudar o efeito de variações de temperatura na amostra. Neste caso, esta geometria tem vantagem sobre a anterior pois o erro introduzido devido ao efeito da temperatura sobre o próprio material de que é constituída é negligenciável, pois o valor do *gap* é muito superior ao truncamento utilizado na geometria cone-placa. A utilização de placas rugosas evita o deslizamento da amostra que pode ocorrer especialmente para temperaturas elevadas.

Tanto para a primeira geometria como para a segunda dois aspectos são extremamente importantes para a redução das fontes de erro. São estes a colocação da amostra e a definição correcta do *gap* ou truncamento. Hoje em dia este último problema raramente se coloca pois os reómetros têm controlo automático de *gap*.

Ambas as geometrias referidas para além de possibilitarem a realização de ensaios de escoamento estacionário em condições controladas, permitem realizar ensaios de deformação oscilatória de natureza sinusoidal (ensaios dinâmicos), úteis para o estudo do comportamento viscoelástico linear dos fluidos.

Os viscosímetros capilares são também instrumentos que permitem estudar comportamentos reológicos dos materiais e estão indicados para fluidos newtonianos com viscosidades compreendidas entre 0,4 e 20000 mPa.s. Neste caso mede-se simplesmente um tempo de escoamento de uma solução diluída dentro de um tubo capilar e compara-se com o tempo de escoamento do solvente utilizado (para o mesmo volume). Estes instrumentos podem funcionar apenas por acção da força gravítica (para baixas viscosidades) ou com o auxílio de instrumentos de pressão (para viscosidades mais elevadas). No presente trabalho foram utilizados viscosímetros de Cannon-Fenske (em forma de “U”) para a determinação de viscosidades relativas de soluções de galactomananas de baixa concentração.

Através de ensaios realizados com viscosímetros capilares obtêm-se parâmetros como a viscosidade relativa (η_{rel}) e a viscosidade específica (η_{esp}) da solução de polímero e por conseguinte um parâmetro intrínseco ao polímero – a viscosidade intrínseca $[\eta]$ – que é definida por:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{esp} / C) \quad (11)$$

onde C é a concentração da solução de polímero (em g/dL).

A viscosidade intrínseca é obtida por aplicação das equações de Huggins e Kraemer (§ 2.4.3) e extrapolação para concentração nula. Este parâmetro está relacionado com volume hidrodinâmico das cadeias de polímero, que por sua vez se relaciona com sua massa molecular e conformação.

1.3.3. Propriedades reológicas de géis de proteínas

Os géis proteicos são classificados como materiais viscoelásticos, significando que exibem um comportamento intermédio entre um líquido perfeito (o fluido de Newton) e o sólido perfeito (o sólido de Hooke). Como tal, os módulos de conservação (G') e de perda (G'') são funções físicas apropriadas para descrever tais materiais.

A medição das propriedades viscoelásticas dinâmicas utilizando a técnica de oscilação não destrutiva, ideal para monitorizar o processo de gelificação, permite um estudo indirecto do efeito de factores físico-químicos, como sejam a concentração, o pH ou a temperatura, no mecanismo de formação de gel. O estudo dos efeitos destes factores nas propriedades viscoelásticas pode ser usado para deduzir os seus efeitos físico-químicos ao nível molecular e assim entender melhor o mecanismo de gelificação (Tang *et al.*, 1993).

A definição de ponto de gelificação, ou seja o ponto correspondente à transição sol-gel do material, em termos de propriedades dinâmicas viscoelásticas, gera alguma controvérsia entre os vários autores que se dedicam a este assunto (Tang *et al.*, 1993). Bohlin em 1984 definiu o ponto de gelificação como sendo o momento em que o ângulo de fase decrescia repentinamente de um valor próximo de 90° (um ângulo de fase igual a 90° corresponde a um líquido perfeito). Por outro lado Richardson e Ross-Murphy (1981) descreveram o ponto de gel como sendo o ponto em que o módulo de conservação (G') se torna detectável em relação ao ruído do aparelho. Outros autores tomam-no ainda como sendo o ponto em que se cruzam os módulos de conservação e de perda (Stading e Hermanson, 1990). O conhecimento do ponto de gelificação pode levar a perceber as condições mínimas requeridas para a gelificação e a sua cinética.

Como foi dito anteriormente, existem vários factores que influenciam a gelificação das PSL, traduzindo-se esta influência em propriedades reológicas distintas. Uma consequência imediata da influência de factores extrínsecos é a concentração mínima de proteína para que ocorra a gelificação. Para uma gama de pH de 2 a 9 e uma concentração de cloreto de sódio variável entre 0 e 0,14 mol/L a concentração mínima para a gelificação da β -lg é muito mais baixa para os géis formados a pH próximo do pI (cerca de 1 g/dL)

do que a pH mais afastado, sendo no primeiro caso independente da força iônica e no segundo caso tanto menor quanto maior a força iônica do meio (Renard e Lefebvre, 1992).

Para além disso, um aumento da concentração de proteína provoca um aumento dos módulos viscoelásticos e um aumento da temperatura leva a uma diminuição do tempo de gelificação dos sistemas de PSL a pH 7. Verheul e Roefs (1998) verificaram que um aumento da concentração de cloreto de sódio e, por outro lado, da temperatura conduz a um aumento dos módulos viscoelásticos dos géis de PSL, em determinadas condições de pH. As condições experimentais, como a frequência de oscilação, também têm influência nas propriedades viscoelásticas dos géis como se verificou para os mesmos sistemas (Tang *et al.*, 1993; Ikeda *et al.*, 2001).

1.3.4. Propriedades reológicas de polissacarídeos

Uma das características fundamentais dos polissacarídeos utilizados na indústria alimentar é a sua capacidade de formar soluções muito viscosas mesmo a baixas concentrações (Neukom, 1989).

A viscosidade intrínseca das soluções de galactomananas está muito dependente do seu grau de ramificação e massa molecular. Assim para a mesma massa molecular a viscosidade intrínseca aumenta com a diminuição do grau de ramificação e para amostras com o mesmo grau de ramificação a viscosidade intrínseca diminui drasticamente com a diminuição da massa molecular (Beer *et al.*, 1999; McCleary, 1981; Monteiro *et al.*, 2005).

A qualidade do solvente também influencia os valores de viscosidade intrínseca de um polímero. Por exemplo, a viscosidade intrínseca de GA e GG diminui com a adição de baixas concentrações de sacarose, depois aumenta até uma concentração de sacarose de cerca de 20% e torna a diminuir com a adição de quantidades mais elevadas deste dissacarídeo (Richardson *et al.*, 1998). O pH também influencia a viscosidade das soluções de galactomananas na medida em que altera a extensão de entrelaçamento macromolecular (Goycoolea *et al.*, 1995).

Os polissacarídeos como as galactomananas exibem um comportamento típico das soluções de biopolímeros. Assim, soluções diluídas de galactomananas exibem um comportamento típico dos fluidos newtonianos, onde a tensão de corte é directamente proporcional á taxa de deformação da amostra (Figura 6), o que significa que a viscosidade é constante (η_0).

À medida que a concentração do polissacarídeo aumenta o seu comportamento afasta-se do fluido newtoniano e torna-se reofluidificante, em que a viscosidade diminui à medida que aumenta a taxa de deformação imposta. Este comportamento pode ser explicado à luz do conceito do entrelaçamento das macromoléculas que, à medida que a taxa de deformação a que a amostra é sujeita aumenta, vai sendo desfeito e as moléculas vão-se alinhando no sentido do escoamento (Lopes da Silva *et al*, 2004). O grau de entrelaçamento das moléculas depende da concentração do polímero (C) e do volume hidrodinâmico da molécula traduzindo-se pelo denominado parâmetro de interpenetração molecular, $C[\eta]$.

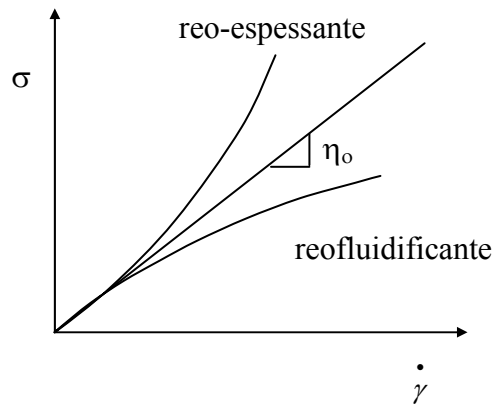


Figura 6 - Comportamento reológico das soluções de biopolímeros

Actualmente existem vários modelos matemáticos que podem ser aplicados para descrever o comportamento reológico de biopolímeros, nomeadamente o comportamento reofluidificante das soluções de polissacarídeos.

De entre os modelos mais utilizados estão o modelo de Cross:

$$\eta = \eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty}) / \left(1 + \alpha \dot{\gamma}^m \right) \quad (12)$$

e o modelo de Carreau:

$$\eta = \eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty}) / \left(1 + \left(\lambda \dot{\gamma} \right)^2 \right)^N \quad (13)$$

onde η é a viscosidade aparente, η_0 a viscosidade a taxa de deformação nula, η_∞ a viscosidade a taxa de deformação infinita, $\dot{\gamma}$ a taxa de deformação, α e λ tempos de relaxação característicos, e m e N constantes. Na grande maioria dos casos η_∞ é desprezável o que simplifica bastante as equações 12 e 13.

As galactomananas exibem um comportamento tipicamente reofluidificante em que para baixas taxas de deformação verifica-se um patamar newtoniano (a viscosidade não varia com a taxa de deformação – a que corresponde η_0) e para taxas de deformação mais elevadas a viscosidade diminui à medida que aumenta a taxa de deformação, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de corte.

A realização de ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação é útil para o estudo das soluções de polissacarídeos, pois permite avaliar o tipo de organização destas macromoléculas, incluindo aspectos conformacionais e interações intermoleculares.

Uma das análises mais frequentes é a avaliação da variação dos módulos viscoelásticos (G' e G'') com a frequência de oscilação (ω) a que o sistema é submetido – o resultado deste tipo de ensaio denomina-se por espectro mecânico.

Em geral para soluções diluídas de polissacarídeos (incluindo as galactomananas) e para baixas frequências de oscilação o carácter viscoso do sistema é muito elevado sendo o módulo de perda superior ao módulo de conservação. À medida que a concentração do polissacarídeo ou a frequência de oscilação aumentam, G' e G'' aumentam, sendo que o primeiro aumenta mais rapidamente com a frequência do que o segundo, podendo eventualmente cruzar-se se o carácter sólido da amostra superar o seu carácter viscoso (Ross-Murphy, 1984).

A estrutura fina, como por exemplo o grau de ramificação e a distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia de manana, pode influenciar as propriedades viscoelásticas das soluções de galactomanana (Clark & Ross-Murphy, 1987). A remoção de mais de 50% das unidades de galactose da goma de guar modifica de tal forma as propriedades viscoelásticas das soluções deste polissacarídeo que os seus espectros mecânicos tornam-se similares aos de verdadeiros géis em que praticamente não há variação de G' em função da frequência, dentro da gama estudada (Wientjes *et al.*, 2001).

1.4. Microestrutura e microscopia de géis

1.4.1. Introdução

Uma das grandes preocupações da indústria alimentar é conceber produtos com as propriedades sensoriais desejadas pelo consumidor. Muitas das operações de processamento alimentar têm em vista a geração de determinada microestrutura de forma a assegurar as propriedades características do produto final. A microscopia fornece muitas das ferramentas necessárias para descrever como é formada uma estrutura em particular e, conseqüentemente, como esta se relaciona com as propriedades do produto. A combinação de métodos microscópicos com outras técnicas pode promover o conhecimento do papel estrutural dos componentes individuais e o seu efeito na microestrutura dos complexos produtos alimentares como um todo (Hermanson *et al.*, 2000).

O modo como as moléculas de PSL se agregam e, conseqüentemente, a microestrutura dos géis formados é também afectada por vários factores, sendo o pH um dos mais evidentes. Um gel consiste numa rede de moléculas de tal modo organizadas que conseguem reter no seu seio uma fase dispersante contínua, que no caso das PSL é a água. As propriedades macroscópicas dos géis de proteínas globulares são governadas pela estrutura microscópica e submicroscópica do gel (Tang *et al.*, 1993 ; Stading *et al.*, 1993; Tolstoguzov, 1998).

Pode-se considerar que todos os géis de PSL se situam algures entre dois extremos: um gel constituído por uma rede tridimensional contínua, fina, linear e estirada e por outro lado um precipitado turvo de aspecto granuloso formado por partículas agregadas. O primeiro tipo de gel existe em condições de pH afastado do ponto isoeléctrico das proteínas e baixa força iónica e o segundo tipo para pH próximo daquele valor e elevada força iónica. O tamanho dos poros existentes em cada um dos tipos de estrutura de gel é também diferente, sendo cerca de três ordens de grandeza superiores no caso dos géis granulosos. A velocidade de aquecimento das dispersões de PSL também tem influência na microestrutura dos géis formados. Stading e colaboradores (1993) demonstraram que o aquecimento rápido (5-10 °C/min) de dispersões de β -lactoglobulina a pH 5,3 produzia géis mais homogêneos e com poros mais pequenos (20-30 μ m) do que quando o aquecimento era mais lento (0,1-1 °C/min, correspondendo a poros de cerca de 100-150 μ m de diâmetro). Estes autores verificaram também a relação entre a microestrutura e as

propriedades reológicas dos géis, tendo concluído que o módulo de conservação era superior no caso das amostras aquecidas mais lentamente.

A melhor forma de conhecer a microestrutura dos géis é de facto observá-la. À partida, no caso das PSL, é possível distinguir os dois tipos de gel a olho nu, pois o gel com estrutura granulosa é opaco enquanto que o outro é translúcido. No entanto, esta é uma observação grosseira que não aprofunda o conhecimento das estruturas em causa. Esta escala é suficientemente grande para se considerar ambos os tipos de gel homogéneos. É necessário ter cuidado ao escolher os métodos experimentais para a caracterização da estrutura dos géis. Um gel homogéneo à primeira vista, quando observado noutra escala pode apresentar uma rede não homogénea em que umas zonas são densas e outras mais diluídas.

A microscopia envolve técnicas que abrangem uma vasta gama de dimensões, entre 10^{-9} e 10^{-3} m, e envolvem diferentes métodos de preparação que permitem focar informação específica como interações entre biopolímeros e estruturas interfaciais e internas (Hermanson *et al.*, 2000). No caso dos géis de PSL as técnicas de microscopia electrónica são muito úteis sendo que a microscopia electrónica de varrimento descreve melhor os géis opacos, enquanto que para os géis translúcidos a microscopia electrónica de transmissão é mais adequada (Stading *et al.*, 1993).

1.4.2. Microscopia Electrónica de Varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) é muito utilizada na visualização de vários tipos de amostras, nomeadamente géis proteicos. Nesta técnica microscópica detectam-se os electrões que são emitidos ou reflectidos da superfície de uma amostra. Esta técnica é muito útil no estudo de vários tipos de amostras mas envolve um processo de preparação das amostras extremamente laborioso. Como os electrões são absorvidos pelo ar a microscopia electrónica decorre em vácuo e as amostras não devem libertar substâncias voláteis (Kaláb *et al.*, 1995). Os processos de preparação da amostra devem ser extremamente cuidados de forma a não destruir a microestrutura dos géis observados e adulterar as conclusões tiradas.

1.4.3. Microscopia Confocal de Varrimento de Laser

A microscopia confocal de varrimento laser (CLSM) é muito útil no estudo de estruturas coloidais e de alimentos. Esta técnica pode ser vista como um tipo especial de

microscopia óptica em que a luz é substituída por um *laser*. O raio *laser* penetra na amostra e excita os corantes fluorescentes acoplados ao objecto de interesse, como lípidos, polissacarídeos ou proteínas. Isto torna possível observar acontecimentos dinâmicos, como alterações que ocorrem durante o arrefecimento, aquecimento ou fluxo, e obter informações importantes para optimização de processos (Hermansson *et al*, 2000).

O termo confocal significa que a informação é obtida num plano e a luz de todos os outros planos é excluída por escudamento com um pequeno orifício. Deslocando o plano confocal podem ser obtidas secções ópticas adjacentes, ou seja, faz-se um seccionamento óptico do objecto em estudo em vez de um seccionamento físico. A informação obtida para uma série de planos é depois usada para construir uma imagem a três dimensões.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1. Amostras

A goma de alfarroba (LBG HG M200) foi cedida pela *INDAL* (Indústrias de Alfarroba, Lda – Faro), Portugal. A goma de guar (Meypro Guar CSAA, M175) foi fornecida pela *Meyhall Chemicall*, Suíça. A goma de tara foi cedida pelo laboratório do Dr. Paul Cairns (Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido).

O isolado de proteínas do soro do leite (IPSL) utilizado neste estudo foi uma amostra não desnaturada e virtualmente livre de lactose, gentilmente cedida pela *Davisco Foods International* (Le Seur MN, USA), constituída essencialmente por β -lactoglobulina e α -lactalbumina (BiPRO, 97.8% proteína, 0.3% gordura, 1.8% cinzas).

2.2. Preparação das amostras de polissacarídeos

2.2.1. Purificação das amostras comerciais

As amostras comerciais de goma de alfarroba (GAcom), guar (GGcom) e tara (GTcom) foram adicionadas lentamente a água destilada sob agitação, mantendo-se a agitação moderada durante 1 h, à temperatura ambiente. Após este período as dispersões foram aquecidas em banho de água a 90 °C, para a GA e GT, e a 70 °C para a GG, e mantidas sob agitação durante 30 min. Depois de arrefecidas as soluções foram centrifugadas a 24400 g, durante 30 min a uma temperatura de 20 °C.

Depois de centrifugadas as soluções de polissacarídeos (≈ 5 g/L) foram adicionadas lentamente a etanol destilado (final 80%, v/v), tendo-se obtido um precipitado branco, amorfo, essencialmente constituído por galactomanana. O precipitado foi depois filtrado em filtro de placa de vidro porosa (G2), lavado com etanol absoluto, acetona e éter etílico, e seco em estufa, a 35°C, durante a noite. As amostras assim obtidas foram pulverizadas com o auxílio de um almofariz e pilão e finalmente guardadas em exsiccador. Obtiveram-se rendimentos de cerca de 76%, 63% e 71% para as gomas purificadas de alfarroba, de guar e de tara, respectivamente, em relação às gomas comerciais.

As gomas purificadas (GApur, GGpur e GTpur) foram utilizadas para os ensaios reológicos onde se utilizaram polissacarídeos não modificados. As amostras GApur e

GGpur foram utilizadas para a obtenção de amostras com grau de ramificação inferior, por tratamento enzimático com α -galactosidade (§ 2.2.2).

2.2.2. Modificação das galactomananas por acção enzimática

Para a diminuição do grau de ramificação das galactomananas purificadas, utilizou-se uma α -galactosidase obtida a partir de sementes de guar (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland) para a hidrólise enzimática das ligações α -1,6 entre os resíduos de galactose e de manose das cadeias de galactomananas. A reacção de hidrólise enzimática foi realizada à temperatura de 40 °C, em tampão acetato 0,5 mol/L (pH 5), tendo-se testado várias concentrações iniciais do polissacarídeo e vários tempos de hidrólise. Após o tempo de incubação pretendido, as misturas foram aquecidas a 100 °C durante 5 min para desnaturação da enzima e paragem da reacção. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente, as soluções foram centrifugadas durante 30 min a 24400 g (20 °C) e, seguidamente, o polissacarídeo foi recuperado por precipitação em etanol como anteriormente referido. Na Figura 7, apresentam-se exemplos da variação da razão man/gal com o tempo de hidrólise para as amostras GApur, GGpur e GTpur.

Como esperado, o grau de ramificação diminui com o aumento do tempo de hidrólise; a taxa de hidrólise aumenta para as amostras de galactomanana com grau de ramificação inicial menor. Verificou-se ainda que a actividade da enzima foi ligeiramente maior para a concentração mais elevada de galactomanana, o que está de acordo com trabalhos de outros autores. Por exemplo Bulpin e co-autores (1990) verificaram que a uma temperatura de 42°C a actividade da α -galactosidase ($3,7 \times 10^{-7}$ U/g guar, 24h) aumentava com a concentração do biopolímero até esta atingir cerca de 10% (m/m).

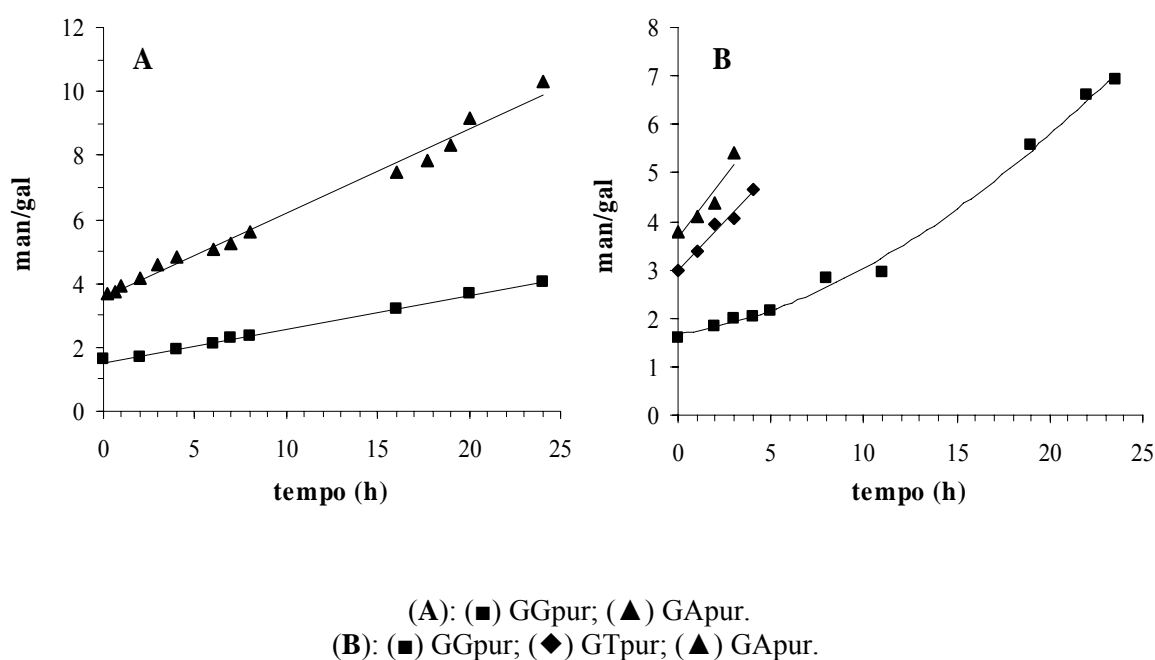


Figura 7 – Razões manose/galactose em função do tempo de hidrólise com α -galactosidase (0,08 U/mL¹, 40 °C, pH 5): (A) galactomanana 1 g/L ; (B) galactomanana 5 g/L.

Para a obtenção das amostras finais usaram-se soluções de gomas purificadas com a concentração de 5 g/L. O tempo de hidrólise escolhido teve como objectivo a obtenção de uma gama relativamente larga de razões man/gal e a obtenção de amostras de galactomananas com origens diferentes mas razão man/gal semelhante.

Para as amostras de goma de alfarroba, goma de guar e goma de tara prepararam-se também amostras de referência tendo-se submetido as amostras purificadas ao mesmo tratamento que as amostras tratadas com a enzima, mas neste caso substituindo a solução de enzima por solução tampão de pH. Deste modo obtiveram-se as amostras designadas por GA0H , GG0H e GT0H.

¹ Uma unidade U de actividade da α -galactosidase é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para libertar 1 mol de *p*-nitrofenol de *p*-nitrofenol- α -galactopiranosídeo.

O diagrama apresentado na Figura 8 resume as amostras de galactomananas preparadas de acordo com o descrito anteriormente.

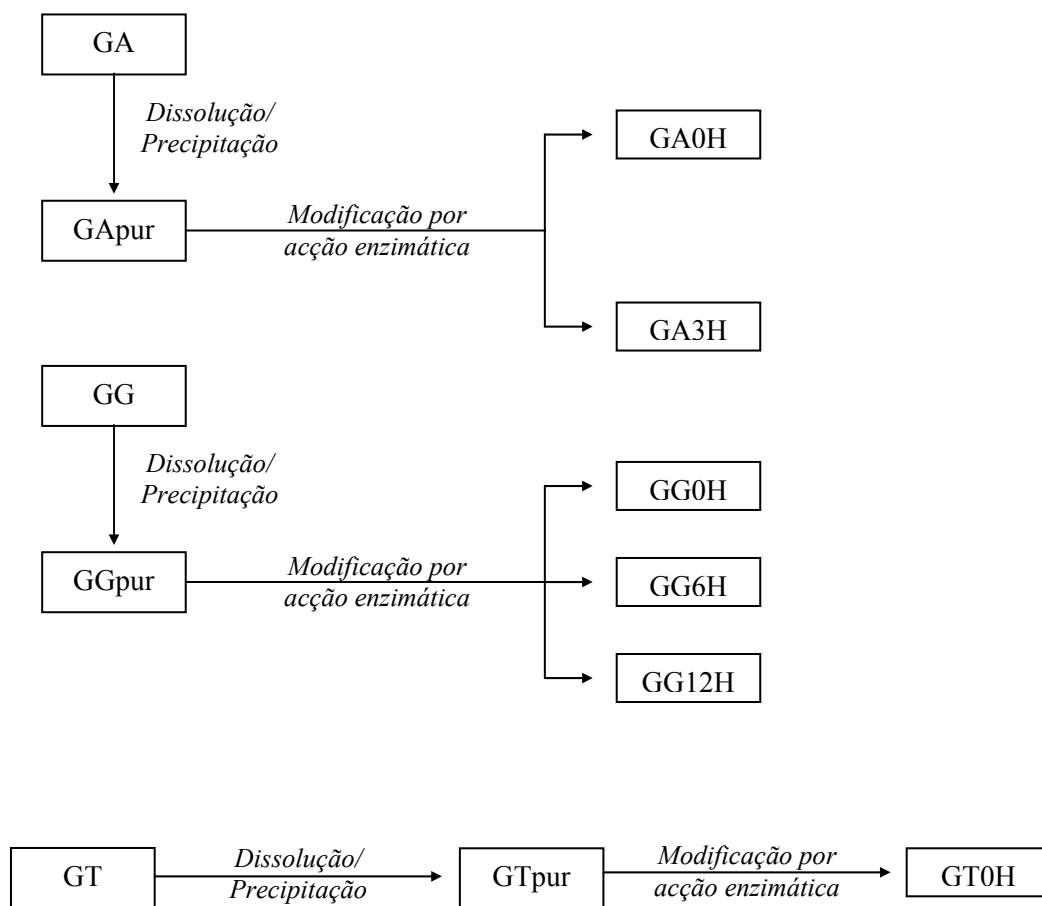


Figura 8 - Esquema do procedimento sequencial para a obtenção das amostras de galactomananas.

2.3. Preparação de soluções

2.3.1. Preparação de soluções de galactomananas

Para os ensaios reológicos e para a preparação das misturas de galactomananas com proteínas do soro do leite, as amostras de polissacarídeos foram dissolvidas em água ultrapura *Mili-Q* (resistividade 18,2 MΩcm) obtida através de um sistema de purificação da Millipore Corp. (Bedford, MA). Utilizou-se azida de sódio (0,02%, m/v) como conservante das soluções. O método de dissolução foi igual ao descrito em § 2.2.1.

Prepararam-se soluções com diferentes concentrações, por diluição com água ultrapura. Cada diluição foi homogeneizada por agitação lenta durante 1 h e desgaseificada a pressão reduzida, com auxílio de uma trompa de água. A concentração final das soluções foi calculada por determinação dos sólidos totais dissolvidos, após secagem das dispersões a 105°C até obter massa constante.

As soluções de polissacarídeos foram testadas no máximo até dois dias após a sua preparação, para evitar os efeitos da agregação das moléculas do biopolímero. O seu armazenamento foi feito à temperatura ambiente.

2.3.2. Preparação de dispersões de isolado de proteína de soro do leite

O IPSL foi adicionado lentamente a água ultrapura *Mili-Q* (resistividade 18,2 MΩcm), à qual se adicionou azida de sódio (0,02 %, m/v), e permaneceu em agitação lenta durante a noite. Depois a dispersão foi centrifugada (10000 g, 20 °C, 15 min) e filtrada por filtro de placa de vidro porosa (G1).

A determinação da concentração das dispersões de IPSL foi feita por medição da densidade óptica a 278 nm, após as diluições necessárias (Renard e Lefebvre, 1992). Prepararam-se soluções com diferentes concentrações por diluição com água ultrapura, homogeneização por agitação lenta durante 1 h e desgaseificação a pressão reduzida. As concentrações estudadas encontraram-se na gama de 5 a 13 g/dL para pH 5 e de 11 a 18 g/dL para pH 7. O pH destas dispersões foi ajustado a 5 ou a 7, com soluções de HCl 1 mol/L, 0,5 mol/L e 0,1 mol/L ou de NaOH com as mesmas concentrações, respectivamente.

As dispersões de IPSL foram armazenadas a 4°C e utilizadas no máximo até 8 dias após a sua preparação.

2.3.3. Preparação de misturas galactomanana/IPSL

As misturas de galactomanana e IPSL efectuaram-se por mistura de soluções de cada biopolímero, com concentração inicial e em proporção mássica adequadas para a concentração final pretendida. Cada mistura foi submetida a agitação lenta durante 1 h à temperatura ambiente e desgaseificada a pressão reduzida.

Para o sistema proteico a pH 5 foram estudadas misturas com uma concentração de proteína de 5 a 13 g/dL e para pH 7 de 10 a 13 g/dL. A concentração de galactomanana nas

misturas variou entre 0,2 e 0,5 g/dL para os sistemas a pH 5 e entre 0,2 e 0,8 g/dL para pH7.

2.4. Caracterização físico-química dos polissacarídeos

2.4.1. Humidade, cinzas e proteína

Os teores de humidade e cinzas das amostras de polissacarídeos comerciais e purificadas foram determinados de acordo com o “*Food Chemicals Codex*” (1981). Todas as determinações foram feitas em duplicado.

Para a determinação da humidade as amostras foram colocadas numa estufa a 105°C durante a noite e, posteriormente, até se verificar uma variação de massa igual ou inferior a 0,005 g entre pesagens consecutivas.

Para a determinação das cinzas incineraram-se as amostras previamente secas com o auxílio de um bico de Bunsen e depois colocaram-se numa mufla a 650 °C durante 4 h.

A quantidade de proteína existente nestas amostras foi determinada por quantificação de azoto pelo método de Kjeldahl, utilizando como factores de conversão 5,87 para a GA, 5,92 para a GG e 6,31 para a GT (Anderson, 1986).

2.4.2. Açúcares neutros

A razão manose/galactose (man/gal) das amostras de galactomananas foi calculada determinando a quantidade de açúcares neutros sob a forma de acetatos de alditol por cromatografia em fase gasosa, com base no procedimento descrito por Blakeney *et al.* (1983).

Cada amostra (1-2 mg) foi dissolvida em 200 µL de H₂SO₄ 72 % (m/m) durante 3 h à temperatura ambiente, com agitação ocasional. As amostras foram depois diluídas com 2,2 mL de água destilada, de modo a diminuir a concentração de H₂SO₄ para 1 mol/L, e aquecidas a 100 °C durante 2,5 h. Após arrefecimento em gelo foram adicionados, a cada amostra, 200 µL de solução aquosa de 2-desoxiglucose (1 mg/mL) como padrão interno. A uma alíquota de 1 mL desta amostra adicionaram-se 200 µL de solução de NH₃ 25% (v/v) para neutralizar o ácido.

Os monossacarídeos foram reduzidos a alditóis por adição de 100 µL de NaBH₄ (15% m/v em NH₃ 3 mol/L) à solução neutralizada, tendo a reacção decorrido durante 1 h

à temperatura de 30 °C. Após arrefecimento em gelo adicionou-se ácido acético glacial (2 x 50 µL) por forma a destruir o excesso de boro-hidreto. De seguida procedeu-se à acetilação dos alditóis adicionando 3 mL de anidrido acético e 450 µL de 1 metil-imidazol (catalisador da reacção), mantendo as amostras novamente a 30 °C durante 30 min. Depois dos tubos arrefecerem foram adicionados 4,5 mL de água destilada para decompor o excesso de anidrido acético.

Os acetatos de alditol foram extraídos com 3 mL de diclorometano, tendo-se agitado vigorosamente os tubos tapados para promover a passagem dos acetatos de alditol para a fase orgânica. As fases foram separadas por centrifugação a 4000 r.p.m. durante 1 min e a fase aquosa removida por aspiração. Adicionaram-se mais 2 mL de diclorometano à fase orgânica e efectuaram-se três lavagens com 3 mL de água destilada, a fim de eliminar completamente o 1-metil-imidazol. Entre cada lavagem, a separação de fases e a remoção da fase aquosa foram realizadas como anteriormente descrito.

A fase orgânica foi então transferida para um tubo limpo e seco e evaporada a 40 °C, sob fluxo de azoto. Por três vezes adicionou-se 1 mL de acetona anidra e evaporou-se para retirar qualquer resíduo de água. Até serem analisadas por GC-FID todas as amostras foram mantidas em ambiente anidro.

Para análise dos acetatos de alditol, as amostras foram novamente suspensas em 50 µL de acetona anidra e injectados 2 µL no cromatógrafo de gases.

O cromatógrafo utilizado foi um Carlo Erba 6000 série 2 com detector de ionização de chama (GC-FID), equipado com uma coluna DB-225 (J&W Scientific, Inc.) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme, um sistema de injeção *split/splitless* e um programa de aquisição e integração *Varian Star Chromatography Workstation*.. O gás de arraste foi o hidrogénio com uma velocidade de fluxo a 220 °C de 1 mL/min.

Depois da injeção a temperatura foi mantida a 220 °C durante 4 min sendo depois aumentada, a 25 °C/min, até aos 230 °C onde se manteve durante 6,5 min. As temperaturas do injector e do detector mantiveram-se nos 220 e 230 °C, respectivamente.

A identificação e quantificação dos resíduos de manose e galactose foram efectuadas por comparação dos tempos de retenção com o de padrões de referência, também derivatizados a acetatos de alditol. Para cada açúcar padrão foram feitas curvas de calibração com sete pontos, em gamas de concentração adequadas.

2.4.3. Viscosidade Intrínseca/ Massa molecular viscosimétrica

Para a determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$), calcularam-se as viscosidades relativa (η_{rel}) e específica (η_{esp}) de diferentes diluições de cada amostra de galactomanana em estudo, com base nos tempos de escoamento medidos com um viscosímetro capilar de Cannon-Fenske, à temperatura de $25 \pm 0,01$ °C.

A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) foi obtida por aplicação das equações de Huggins (Eq. 14) e Kraemer (Eq. 15):

$$\eta_{esp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2 C \quad (14)$$

$$(\ln \eta_{rel})/C = [\eta] - k''[\eta]^2 C \quad (15)$$

onde k' e k'' são as coeficientes de Huggins e Kraemer, respectivamente, e C a concentração da solução.

As massas moleculares médias viscosimétricas (M_v) foram calculadas utilizando a relação de Mark-Houwink proposta por Doublier e Launay (1981), tendo em conta o diferente grau de ramificação (razão man/gal) de cada amostra:

$$[\eta] = 11,5 \times 10^{-6} ((1-\alpha)M_v)^{0,98} \quad (16)$$

onde $\alpha = \text{gal}/(\text{man}+\text{gal})$.

2.5. Caracterização reológica

2.5.1. Equipamento

Todos os ensaios reológicos foram efectuados em reómetros de tensão controlada, *Bohlin CVO 120HR* (

Figura 9) e *TA AR-1000* (Figura 10), equipados com sistemas *Peltier* de controlo de temperatura e sistemas de medida cone-placa e placa-placa, dependendo do tipo de ensaio.



Figura 9 - Reómetro *Bohlin CVO 120 HR*



Figura 10 - Reómetro *TA Instruments AR-1000*

2.5.2. Métodos utilizados

2.5.2.1. Caracterização das soluções de polissacarídeos

Estudou-se o comportamento das soluções de polissacarídeos com várias concentrações utilizando como sistema de medida geometrias cone-placa com diferentes dimensões: cone em aço inoxidável de diâmetro 40 mm e ângulo de 4°, 92 µm de truncamento, para as soluções com concentração igual ou acima de 0,5 g/dL, ou cone em acrílico de 60 mm de diâmetro e ângulo de 2°, 54 µm de truncamento para as soluções com concentração abaixo de 0,5 g/dL. As amostras foram colocadas na placa fixa do reómetro e foram realizados ensaios de oscilação (varrimentos em frequência de 0,05 a 100 rad/s, a baixa amplitude de deformação (5-10%)) e de escoamento (gama de tensões de corte variáveis dependendo da viscosidade da amostra), à temperatura de 25 °C.

Em todos os ensaios efectuados cobriu-se a superfície exposta da amostra com óleo mineral de baixa viscosidade, com o objectivo de evitar a evaporação do solvente.

2.5.2.2. Caracterização dos géis de IPSL e das misturas

Para avaliação aproximada da concentração mínima de IPSL necessária para ocorrer gelificação e para selecção da gama de concentração a estudar para o IPSL, a dois valores de pH diferentes e para misturas com galactomananas, realizaram-se ensaios prévios de gelificação para uma vasta gama de concentrações de dispersões de IPSL a pH 5 e 7. Para tal utilizaram-se tubos de ensaio nos quais se colocaram as várias dispersões a estudar. Estes tubos foram inseridos num banho de água previamente aquecido a 90°C, onde se mantiveram durante 15 min. Após este tempo retiraram-se os tubos e deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente.

Depois de arrefecerem observou-se o comportamento do seu conteúdo, inclinando cuidadosamente os tubos. Considerou-se que estávamos perante um gel quando a amostra não fluía sob o seu próprio peso.

Os métodos reológicos para caracterização dos géis de IPSL e de misturas de ISPL com galactomanana envolveram dois tipos de ensaios: ensaios isotérmicos a 80 °C e ensaios durante os quais se variou a temperatura a que a amostra estava sujeita.

No primeiro caso, utilizou-se como sistema de medida um cone em aço inoxidável de diâmetro 40 mm e ângulo de 4°, truncamento 150 µm. As amostras foram colocadas na

placa inferior (fixa) a uma temperatura de 40 °C e após baixar o cone a temperatura foi elevada rapidamente (cerca de 1,5 s) até 80 °C. Registou-se a evolução dos módulos viscoelásticos durante 3 h a uma frequência de oscilação de 5 rad/s, aplicando uma tensão necessária para obter 1% ou 0,3% de deformação (a primeira para os sistemas a pH 7, a segunda para os sistemas a pH 5). Imediatamente a seguir fizeram-se ensaios de varrimento em frequência de 0,05 a 50 rad/s, mantendo a temperatura a 80 °C, e depois um novo varrimento em tempo após se ter baixado a temperatura para 20 °C, seguido de um novo varrimento em frequência a esta temperatura.

No segundo caso, para os ensaios não-isotérmicos, utilizou-se como sistema de medida uma geometria placa-placa com uma placa superior rugosa de diâmetro 40 mm, com uma separação (H) de 1 mm da placa inferior. As amostras foram colocadas na placa inferior a 40 °C e de seguida fez-se aumentar a temperatura até 90 °C a uma velocidade de 1 °C/min, medindo-se a evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura, nas mesmas condições de frequência de oscilação e de amplitude de deformação usadas nos ensaios isotérmicos. No final deste ensaio manteve-se a temperatura a 90 °C durante 5 min e de seguida fez-se um varrimento em frequência de 0,05 a 50 rad/s. Finalmente fez-se descer a temperatura até 20 °C, novamente a uma velocidade de 1°C/min, e atingindo os 20 °C fez-se um varrimento em frequência de 0,05 a 50 rad/s Hz.

Em todos os ensaios efectuados cobriu-se a superfície exposta da amostra com óleo mineral de baixa viscosidade, com o objectivo de evitar a evaporação do solvente.

2.6. Microscopia

2.6.1. Microscopia electrónica de varrimento

A microestrutura de géis de IPSL e de IPSL+galactomanana a pH 5 foi estudada recorrendo a microscopia electrónica de varrimento (SEM).

Para a análise por SEM, as dispersões das amostras a estudar foram colocadas em tubos de ensaio tapados e gelificadas por aquecimento em banho de água a 90 °C, durante 15 min. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e cortaram-se cubos de cerca de 5 mm de lado, com auxílio de uma lâmina. Mergulharam-se os cubos numa solução de gluteraldeído 2,5 % (preparada em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,2) e deixou-se na câmara frigorífica durante 12 h (etapa de fixação). Estas alíquotas foram

então lavadas com tampão cacodilato (3 x 30 min + 1h) e, posteriormente, desidratadas com passagens em etanol de concentração crescente (20 min cada com etanol a 30, 50, 70, 80, 90 e 2 x 100%). Após desidratação, as amostras foram mergulhadas em hexa-metil-dissilano (HMDS) durante 10 min, secas e recobertas com ouro.

A análise microscópica realizou-se em microscópio electrónico *JEOL* modelo *JSM-5400*, operado a 15 kV.

2.6.2. Microscopia confocal de varrimento de laser

A microestrutura de géis de IPSL e de IPSL+galactomanana a pH 7 foi estudada recorrendo a microscopia confocal de varrimento laser (CLSM).

Para a análise por CLSM adicionou-se às soluções das amostras a estudar (preparadas como descrito em § 2.3) rodamina-B (~ 10 µg/g proteína) com o objectivo de "marcar" as proteínas.

Cada mistura a testar foi colocada, à temperatura ambiente, numa lâmina escavada e tapada com uma lamela. De seguida, este conjunto foi colocado na placa inferior do reómetro a 40 °C, baixou-se a placa móvel até ficar o mais próximo possível da lâmina e sujeitou-se a amostra a um tratamento térmico semelhante àquele utilizado nos ensaios reológicos.

As imagens microscópicas foram obtidas com um microscópio óptico confocal *Leica SP2 AOBS* utilizando uma linha de base HeNe de 543 nm. O sinal fluorescente foi recolhido dentro de uma gama espectral de 530 a 630 nm e processado com *ImageJ*.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1. Caracterização físico-química dos polissacarídeos

3.1.1. Humidade, cinzas e proteína

Foram determinados os teores de humidade, cinzas e proteína das farinhas comerciais e purificadas de goma de alfarroba, tara e guar (Tabela 4).

Verificou-se que o teor de proteína e de cinzas diminuiu devido ao processo de purificação utilizado, à semelhança do verificado em trabalhos anteriores (p.ex., Lopes da Silva e Gonçalves, 1990). A presença de proteínas nas farinhas comerciais pode ter origem em algumas enzimas, como β -mananase, α -galactosidase ou β -manosidase, ou em contaminação proveniente do gérmen. O processo de purificação das galactomananas envolve dois passos essenciais: O primeiro é a dissolução em água e centrifugação e o segundo a precipitação em etanol. Este processo é muito eficaz na eliminação das proteínas porque, por um lado, no primeiro passo, as proteínas que não se dissolveram são eliminadas na centrifugação; por outro lado, o segundo passo envolve a precipitação de moléculas de elevada massa molecular, onde não estão incluídas algumas das proteínas de menor massa molecular e a maioria dos sais minerais.

Tabela 4 - Teores de proteína, cinzas e humidade para as amostras comerciais e purificadas das gomas de alfarroba, guar e tara (os valores apresentados correspondem à média de dois ensaios).

<i>Amostra</i>		<i>Proteína</i>	<i>Humidade</i>	<i>Cinzas</i>
Alfarroba	GAcom	6,11 \pm 0,01	8,95 \pm 0,001	0,84 \pm 0,02
	GApur	1,90 \pm 0,19	11,32 \pm 0,15	0,23 \pm 0,01
Guar	GGcom	4,30 \pm 0,16	8,70 \pm 0,06	1,13 \pm 0,02
	GGpur	0,98 \pm 0,03	4,20 \pm 0,05	0,40 \pm 0,01
Tara	GTcom	5,87 \pm 0,02	12,82 \pm 0,17	2,24 \pm 0,03
	GTpur	1,32 \pm 0,03	13,43 \pm 0,13	1,65 \pm 0,06

No que respeita ao teor de humidade verificou-se que este era superior na goma purificada em comparação com a farinha comercial.

3.1.2. Razão manose/galactose

Todas as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo em açúcares neutros pelo método descrito na secção 2.4.2. Dado que se tratam de galactomananas a sua composição consiste essencialmente em manose e galactose, variando de amostra para amostra a proporção entre estes dois monómeros. Verificou-se também a presença de alguns vestígios de outros açúcares, embora em quantidades próximas dos limites de detecção do próprio método. De entre estas quantidades vestigiais a glucose foi a que apresentou valores mais elevados, não sendo isto de estranhar pois trata-se de um epímero tanto da manose como da galactose.

Neste trabalho não são apresentados os valores efectivos das quantidades de açúcares neutros obtidas para cada uma das amostras, mas sim as razões man/gal, pois foi este factor que se pretendeu relacionar com as propriedades reológicas das galactomananas e com o efeito destes polissacarídeos na gelificação do IPSL. A Tabela 5 resume algumas das características das amostras de galactomananas testadas neste trabalho. Os valores encontrados são concordantes com a gama de valores descrita na literatura (Daas *et al.*, 2000; Fernandes, 1995; Lazaridou *et al.*, 2000; Gaisford *et al.*, 1986).

De entre as gomas purificadas a que possui menor man/gal é a de guar (~1,5) e a goma de alfarroba é a que possui uma razão maior (~3,8). Comparando as gomas comerciais e purificadas verificou-se que para a GA a razão man/gal aumentou aquando da purificação, o que poderá estar relacionado com o facto de algumas cadeias de menor massa molecular e mais substituídas, logo mais solúveis em água, não terem sido precipitadas pelo etanol. No que respeita à GG a razão man/gal manteve-se praticamente inalterada após o processo de purificação.

Quanto às fracções obtidas por tratamento enzimático das gomas purificadas, as razões man/gal, tal como esperado, aumentaram com o aumento do tempo de hidrólise. O tratamento da GGpur (man/gal~1,5) com α -galactosidase durante 6 h permitiu obter uma amostra de guar com uma razão man/gal de ~2,3 e a hidrólise de 12 h da mesma goma permitiu obter uma amostra de guar com uma razão man/gal aproximada de 3,7 semelhante à da GA0H. Em relação à amostra de GA3H verificou-se que a razão man/gal desta aumentou cerca de 43% comparativamente à GA0H (amostra que sofreu o mesmo tratamento que a GA3H, mas sem adição de enzima).

Tabela 5 - Razões manose/galactose, viscosidades intrínsecas $[\eta]$ e massas moleculares viscosimétricas das amostras de galactomananas (*).

<i>Amostra</i>	<i>man/gal</i>	$[\eta]$ dL/g	M_v
GAcom	$3,38 \pm 0,07$	-	-
GApur	$3,75 \pm 0,04$	$12,9 \pm 0,3$	$1,88 \times 10^6$
GA0H	$3,72 \pm 0,15$	$13,6 \pm 0,4$	$1,99 \times 10^6$
GA3H	$5,28 \pm 0,03$	$14,7 \pm 0,1$	$2,02 \times 10^6$
GGpur	$1,50 \pm 0,05$	$16,1 \pm 0,3$	$3,10 \times 10^6$
GG0H	$1,47 \pm 0,07$	$16,2 \pm 0,1$	$3,15 \times 10^6$
GG6H	$2,28 \pm 0,02$	$19,1 \pm 0,4$	$3,19 \times 10^6$
GG12H	$3,69 \pm 0,09$	$20,8 \pm 0,8$	$3,07 \times 10^6$
GTpur	-	$14,0 \pm 0,3$	-
GT0H	$2,99 \pm 0,32$	$14,2 \pm 0,6$	$2,18 \times 10^6$

(*) Os valores apresentados são médias \pm desvio padrão de três ensaios

3.1.3. Viscosidade intrínseca e massa molecular viscosimétrica

A viscosidade intrínseca é uma propriedade característica das macromoléculas isoladas em determinado solvente, pois está relacionada com o volume hidrodinâmico ocupado pelo polímero, estando dependente da massa molecular e da conformação da molécula, assim como das propriedades do solvente em que se encontra (Lopes da Silva *et al.*, 2004). Os valores de viscosidade intrínseca foram obtidos de acordo com o descrito na secção 2.4.3. e estão apresentados na Tabela 5, assim como os valores calculados para as massas moleculares viscosimétricas, utilizando a equação 16. Estes valores são semelhantes aqueles já descritos na literatura (Fernandes, 1995; Brummer *et al.*, 2003; Lopes da Silva e Gonçalves, 1990; Lazaridou *et al.*, 2000).

Considerando as gomas da mesma origem, a diminuição do grau de ramificação por acção enzimática (aumento de man/gal) levou a um aumento da viscosidade intrínseca. Isto significa, atendendo a que não existe alteração significativa da massa molecular da galactomanana, que o volume hidrodinâmico ocupado pelo biopolímero aumentou com a

diminuição do grau de ramificação. Em relação à amostra de GA3H verificou-se um aumento na viscosidade intrínseca de 1,1 dL/g em relação à GA0H e a GG12H teve uma diferença de 4,6 dL/g em relação à galactomanana que lhe deu origem. Mesmo considerando a concentração em manose (e não a concentração total da galactomanana), verificou-se uma diferença apreciável entre a viscosidade intrínseca das gomas de GG0H e as restantes duas gomas de guar, ao contrário do sugerido por McCleary e Neukom (1982).

3.2. Caracterização reológica dos polissacarídeos

3.2.1. Ensaio de escoamento

As soluções diluídas de polissacarídeos exibem normalmente um comportamento newtoniano, mas quando a concentração destes biopolímeros aumenta o seu comportamento reológico desvia-se do comportamento de um fluido ideal para apresentar um comportamento reofluidificante, em que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação (Figura 6).

Realizaram-se ensaios de escoamento para várias soluções das galactomananas em estudo, para concentrações entre aproximadamente 0,1 e 1,2 g/dL. Como exemplo, na Figura 11 comparam-se as diferentes amostras para dois valores de concentração 0,2 e 0,8 g/dL.

Para o valor mais baixo de concentração verificou-se que todas as soluções apresentaram um comportamento próximo do comportamento de um fluido newtoniano, em que a viscosidade praticamente não varia com a taxa de deformação. Para todas as amostras tornou-se evidente o aumento do carácter reofluidificante com o aumento da concentração do polissacarídeo.

Verificou-se que a viscosidade aparente das soluções variava consoante a razão man/gal das galactomananas. Assim para as gomas de guar verificou-se que a mais ramificada era a goma que apresentava uma viscosidade aparente a taxa de deformação nula (η_0) menor e que este valor foi aumentando à medida que aumentava a razão man/gal.

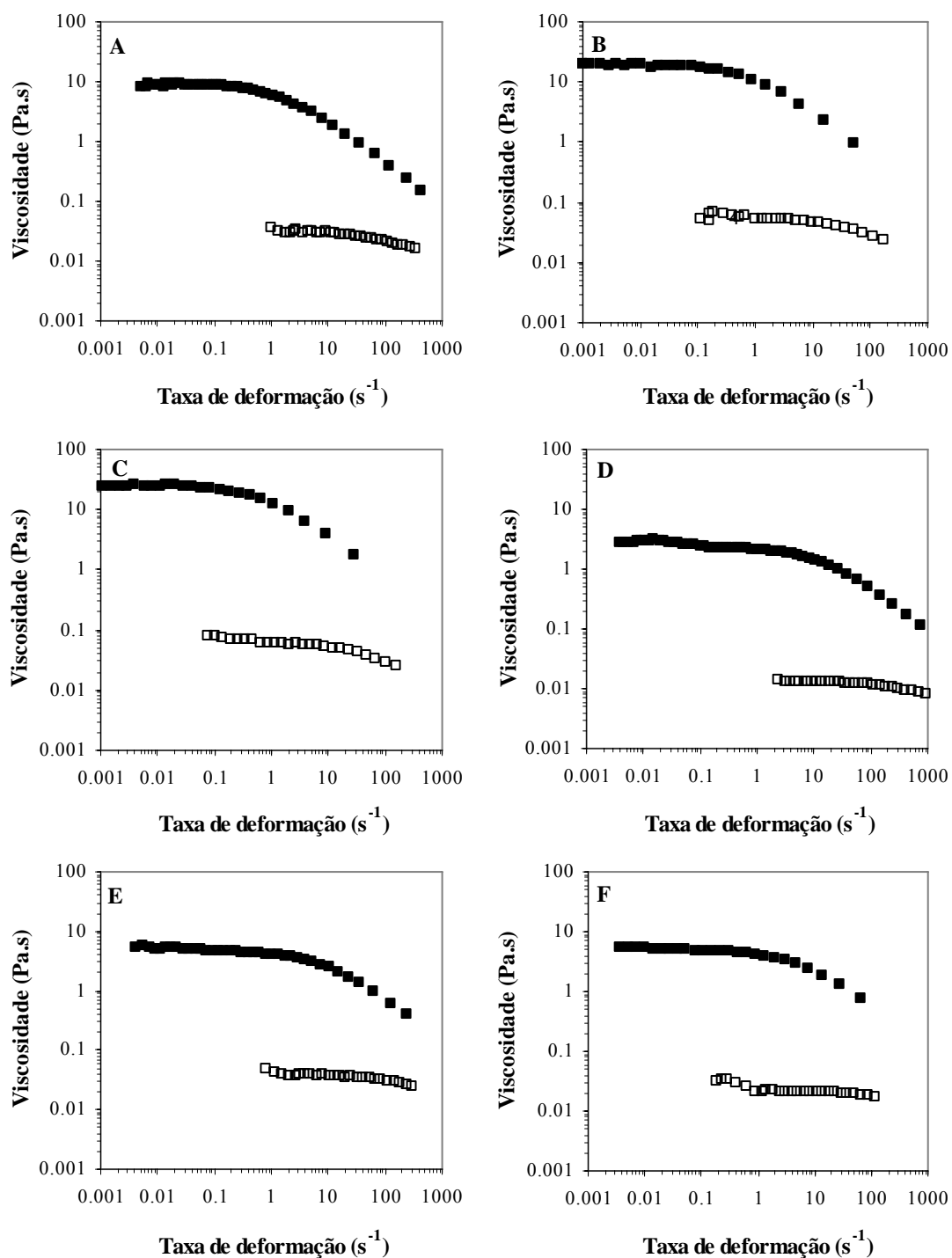


Figura 11 – Curvas de escoamento (viscosidade aparente em função da taxa de deformação) para soluções de amostras de (A) GG0H; (B) GG6H; (C) GG12H; (D) GA0H; (E) GA3H e (F) GT0H com as concentrações 0,2 g/dL (símbolos abertos) e 0,8 g/dL (símbolos a cheio).

O mesmo se verificou para a GA0H e GA3H, sendo que esta última apresentava um valor de η_0 mais elevado que a primeira, quando comparadas soluções com a mesma concentração. A GT0H apresentou uma viscosidade aparente, a taxa de deformação nula, intermédia das de GA0H e GG0H. Os ensaios de escoamento das várias amostras vieram confirmar o que já se tinha concluído com a observação dos valores das viscosidades intrínsecas: dentro da mesma origem de goma a viscosidade das soluções aquosas aumentou com o aumento do grau de ramificação.

No que respeita ao início do comportamento reofluidificante verificou-se que este correspondia a uma taxa de deformação menor para as amostras de guar enquanto que tinha início para taxas de deformação superiores para as amostras de alfarroba. Para além disso a viscosidade das amostras das gomas de guar apresentou uma dependência da taxa de deformação maior do que a das restantes gomas, evidenciado pelos declives das curvas na Figura 11.

Para as diferentes amostras e concentrações ensaiadas, determinaram-se os valores de viscosidade a taxa de deformação nula (η_0) e, a partir destes, os correspondentes valores de viscosidade específica ($\eta_{esp0} = (\eta_0 - \eta_{0H_2O})/\eta_{0H_2O}$). Os valores de η_0 foram obtidos por aplicação do modelo de Cross (eq. 13) a cada uma das curvas de escoamento obtidas para as várias concentrações testadas (entre 0,1 e 1,2 g/dL). A (Figura 12) apresenta um exemplo do bom ajuste aos dados experimentais obtido com este modelo.

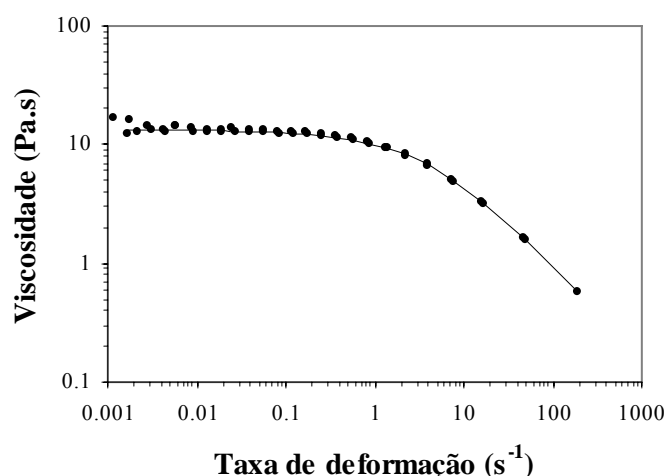
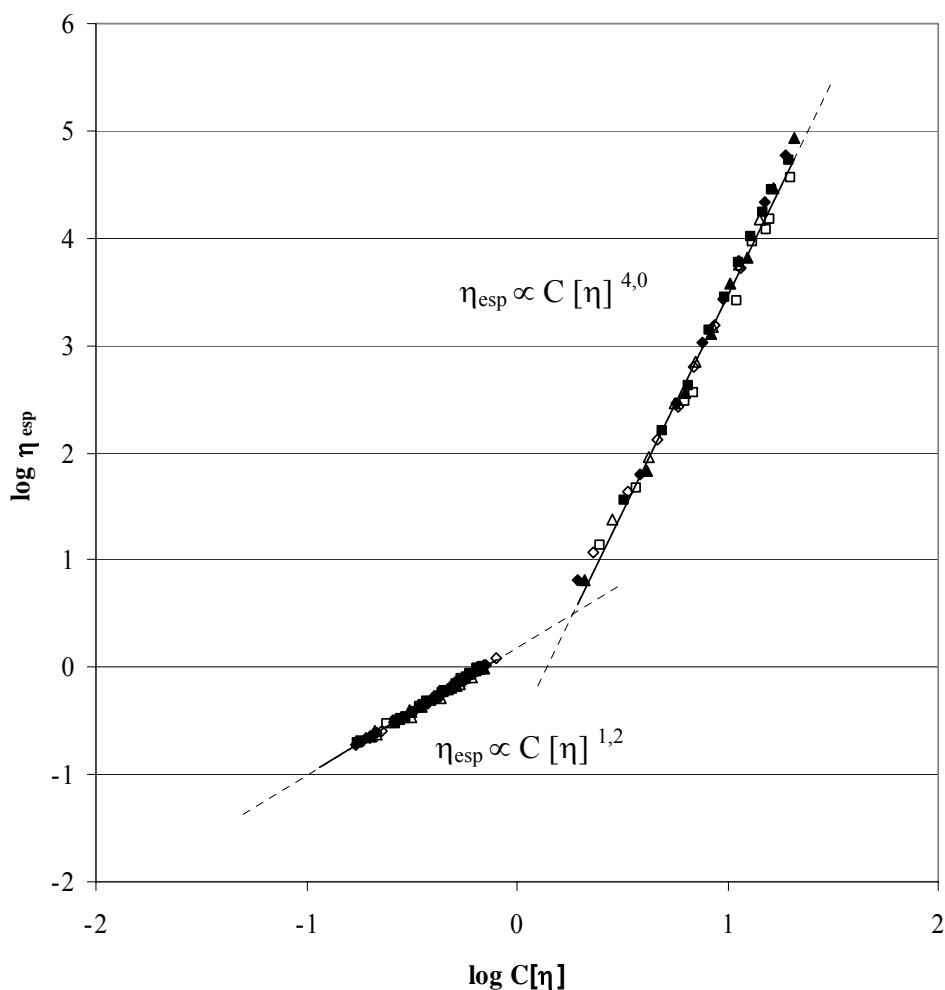


Figura 12 - Aplicação do modelo de Cross (—) ao ensaio de escoamento para uma solução de GT0H 1 g/dL

Apesar das diferenças observadas entre as amostras em estudo, quer seja para os valores de viscosidade quer seja para o início do carácter reofluidificante, a dependência da viscosidade específica face ao parâmetro de interpenetração molecular ($c[\eta]$) das amostras de galactomananas analisadas segue o comportamento generalizado observado para este tipo de polissacarídeos (Morris *et al.*, 1981). Assim no gráfico do logaritmo da viscosidade específica ($\log \eta_{\text{esp}}$) em função do produto da concentração de galactomanana pela viscosidade intrínseca ($\log c[\eta]$), todas as amostras analisadas apresentam um comportamento semelhante, sem que seja possível distinguir o efeito do grau de ramificação ou da origem destes polissacarídeos (Figura 13).



(■) GG0H; (◆) GG6H; (▲) GG12H; (□) GA0H; (◇) GA3H; (△) GT0H

Figura 13 - Curva Mestra ($\log C[\eta]$ em função de $\log \eta_{\text{esp}}$) para várias amostras de galactomananas

No gráfico desta figura é possível verificar a influência da concentração e do volume hidrodinâmico do polissacarídeo na viscosidade das suas soluções aquosas. Para soluções diluídas a dependência da viscosidade face à concentração de polímero é muito inferior à verificada para soluções concentradas, basta verificar os declives das curvas correspondentes: 1,2 no primeiro caso e 4,0 no segundo. A transição entre estes dois regimes não corresponde a uma concentração bem definida mas a uma zona denominada regime semi-diluído (Blanshard, 1982). Para concentrações abaixo desta zona a viscosidade depende essencialmente do volume hidrodinâmico ocupado por cada macromolécula, volume este que depende da massa molecular e da conformação desta. Para concentrações elevadas o efeito da interpenetração entre as moléculas de polímero passa a predominar. Os valores dos declives das curvas de $\log \eta_{\text{esp}}$ em função de $\log c[\eta]$ para diversos biopolímeros varia entre 1,1 e 1,4 para o regime diluído e entre 3,3 e 5,1 para o regime concentrado (Lopes da Silva *et al.*, 2004).

3.2.2. Ensaio de oscilação

Os ensaios reológicos em regime oscilatório são métodos dinâmicos que quando realizados a baixa amplitude de deformação são particularmente úteis para avaliação da organização macromolecular, incluindo aspectos conformacionais e interações intermoleculares.

Foram obtidos espectros mecânicos (módulos viscoelásticos em função da frequência de oscilação) para as várias amostras em estudo e diferentes concentrações. Na Figura 14 apresentam-se como exemplo os resultados obtidos para a concentração de 0,8 g/dL em galactomanana. Estes espectros mecânicos são típicos do comportamento viscoelástico observado para biopolímeros com as características das galactomananas. Verifica-se uma grande dependência dos módulos viscoelásticos face à variação da frequência de oscilação. Verifica-se também que para frequências baixas, em que o comportamento viscoelástico é controlado pelo movimento translacional das moléculas, o módulo de perda é superior ao módulo de conservação. À medida que a frequência (ou a concentração) aumenta, o valor de G' aproxima-se de G'' acabando eventualmente por se cruzar numa zona de frequência em que o intervalo de tempo correspondente a um período

de oscilação não é suficientemente largo para permitir o rompimento do entrelaçamento macromolecular e isso traduz-se num armazenamento de mais energia elástica.

No caso das amostras estudadas verificou-se que dentro da mesma origem de goma a diminuição do grau de ramificação levou a um aumento dos módulos viscoelásticos e a um cruzamento de G' com G'' para frequências mais baixas. Comparando as amostras originais de diferentes origens verificou-se que a goma mais ramificada (guar) apresentava módulos viscoelásticos mais elevados e um cruzamento destes para frequências mais baixas, enquanto que a goma de alfarroba se situou no extremo oposto.

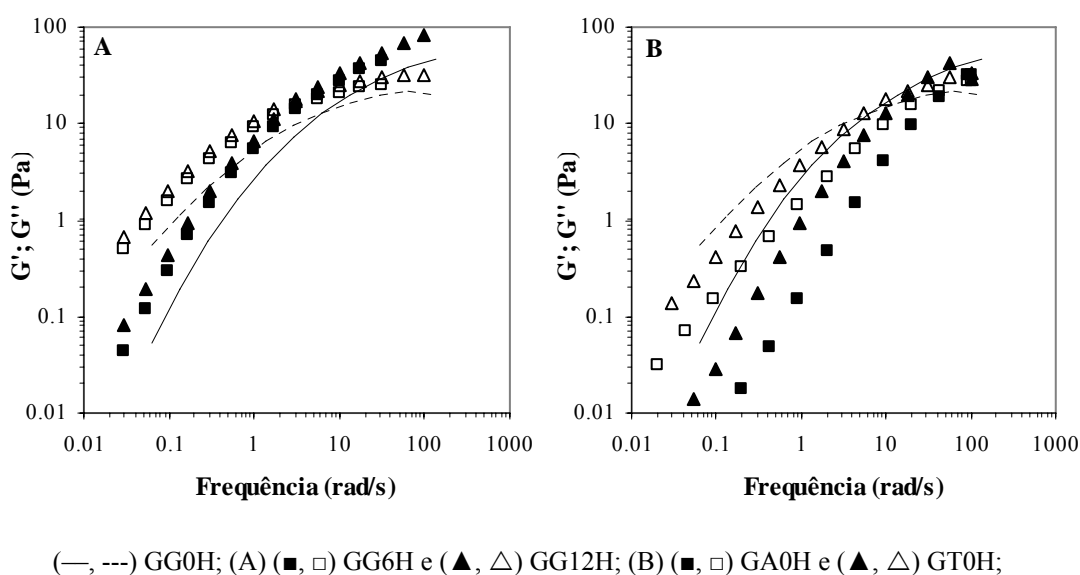


Figura 14 - Espectros mecânicos das amostras de galactomananas, 0,8 g/dL a 25°C (G' símbolos fechados e linha a cheio; G'' símbolos abertos e linha tracejada).

3.3. Gelificação do IPSL

3.3.1. Determinação da concentração mínima aproximada de gelificação do IPSL

O estudo da gelificação do IPSL iniciou-se pela detecção semi-empírica do ponto de gelificação por observação visual de dispersões de IPSL, previamente aquecidas a 90°C como descrito anteriormente (§ 2.5.2.2), a várias concentrações e dois valores de pH, um próximo do ponto isoelétrico com o valor de $5,0 \pm 0,1$ e o outro com o valor de $7,0 \pm 0,1$.

Ao inclinar cuidadosamente os tubos de ensaio verificou-se que em alguns casos a amostra fluía rapidamente e noutros não se deformava mesmo estando o tubo virado ao contrário e sendo agitado. Outros casos houve em que a amostra se deformava e depois fluía com uma pequena agitação do tubo. Considerou-se que este último caso correspondia à transição sol-gel da respectiva amostra, tendo como base os critérios descritos por Renard e Lefebvre em 1992.

Assim concluiu-se que a concentração mínima para gelificação das dispersões do IPSL foi cerca de 2 g/dL, a pH 5, e de 11 g/dL a pH 7

A pH neutro os géis apresentaram-se de cor ligeiramente amarelada, mas translúcida, enquanto que a pH 5, próximo do ponto isoelétrico das PSL, os géis eram de cor branca e completamente opacos (Figura 15).

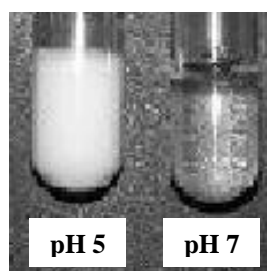


Figura 15 - Géis de IPSL a diferentes pH

3.3.2. Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear

Os ensaios reológicos dinâmicos realizados ao longo deste trabalho foram ensaios chamados de não-destrutivos, em que a tensão aplicada nas amostras tem um valor tal que a estrutura do material não é modificada. Antes de dar início aos ensaios foi necessário analisar em que condições isto acontecia, ou seja, investigar a zona de viscoelasticidade linear das amostras de IPSL.

Com este objectivo realizaram-se ensaios em que se variou a tensão sinusoidal aplicada sobre a amostra e registou-se a deformação imposta.

A observação da Figura 16 onde se apresentam os valores do módulo de conservação reduzido (G'/G'_0 , onde G'_0 é o valor de módulo de conservação no início do ensaio de varrimento de tensão) permitiu desde logo verificar uma diferença fundamental entre os dois sistemas proteicos estudados. Assim, verificou-se que o sistema de IPSL a pH próximo do ponto isoelétrico mostrava uma sensibilidade à tensão aplicada muito

superior, encontrando-se um limite máximo de deformação por volta de 0,3%, enquanto que para o sistema a pH 7 este limite foi cerca de dez vezes superior. Estes resultados encontram-se de acordo com outros referidos na literatura (Clark & Ross-Murphy, 1987).

Tendo em conta estes resultados decidiu-se realizar todos os ensaios dinâmicos para os sistemas a pH 5 com uma deformação imposta de 0,3% e para os sistema a pH 7 uma deformação de 1%.

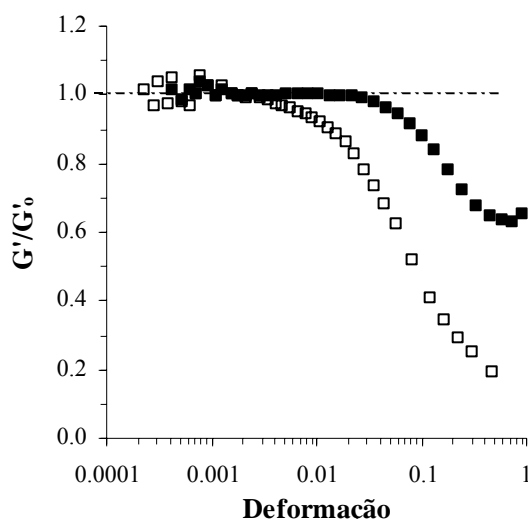


Figura 16 – Módulo de conservação reduzido (G'/G'_0) em função da deformação para os géis de IPSL (proteína 13 g/dL), a 20°C, e frequência 5 rad/s: (■) pH 7; (□) pH 5. G'_0 é o módulo de conservação no início do ensaio de varrimento de tensão.

3.3.3. Ensaio isotérmicos

Investigou-se a evolução temporal das propriedades viscoelásticas de dispersões de IPSL para várias concentrações, a dois valores de pH - um próximo do ponto isoelétrico das IPSL e a pH neutro.

A Figura 17 apresenta a evolução ao longo do tempo do módulo de conservação (G') e da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta = G''(t)/G'(t)$) de dois sistemas aquosos de IPSL, em que a concentração de proteína era de 13 g/dL, um a pH 5 e o outro a pH 7. Na primeira parte da experiência a temperatura foi mantida a 80°C durante 3 h. Após este período de tempo realizou-se um espectro mecânico à mesma temperatura durante 20 min e de seguida baixou-se rapidamente a temperatura para 20°C e registou-se a evolução dos sistemas durante 2 h. Os perfis obtidos estão de acordo com o comportamento geralmente

observado para processos de gelificação de biopolímeros incluindo as PSL (Fernandes, 1994; Aguilera, 1995; Kavanagh *et al.*, 2000).

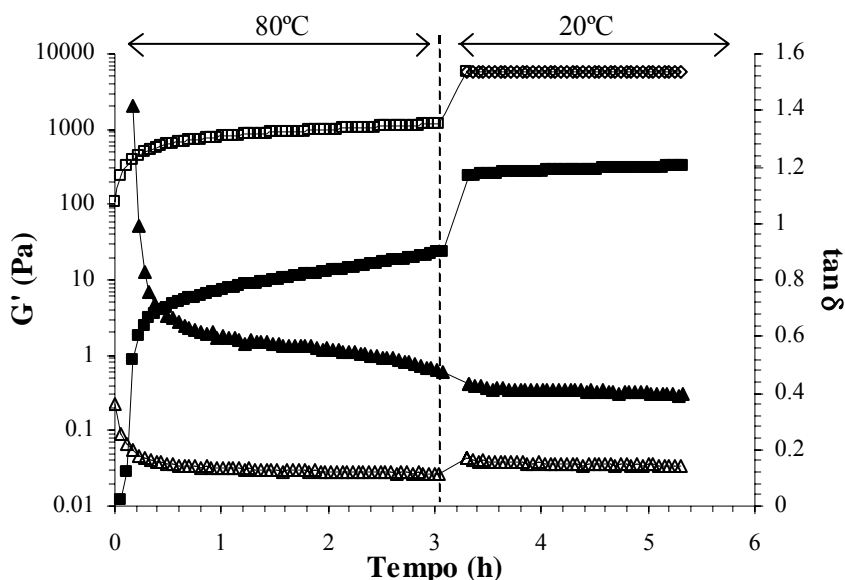


Figura 17 - Cinéticas de maturação dos géis de IPSL (proteína 13 g/dL) a pH5 (símbolos abertos) e pH 7 (símbolos a cheio) a 80°C, seguido de 20°C (5 rad/s): (■, □) $G'(t)$ e (▲, △) $\tan \delta$.

Na experiência a 80°C verificou-se uma evolução extremamente rápida do módulo de conservação, na primeira meia hora, para ambos os sistemas, após a qual a evolução tornou-se mais lenta com tendência para atingir um valor assintótico. Ao longo de toda a experiência verificou-se que o valor de G' para o sistema a pH 5 era muito superior ao do sistema a pH 7, significando uma maior rigidez do gel, e que atingiu um patamar de pseudo-equilíbrio mais rapidamente. Para além disso, para o sistema a pH 5 observou-se valores de $\tan \delta$ muito inferiores aos observados para pH 7, o que é uma característica de sistemas com carácter elástico mais pronunciado.

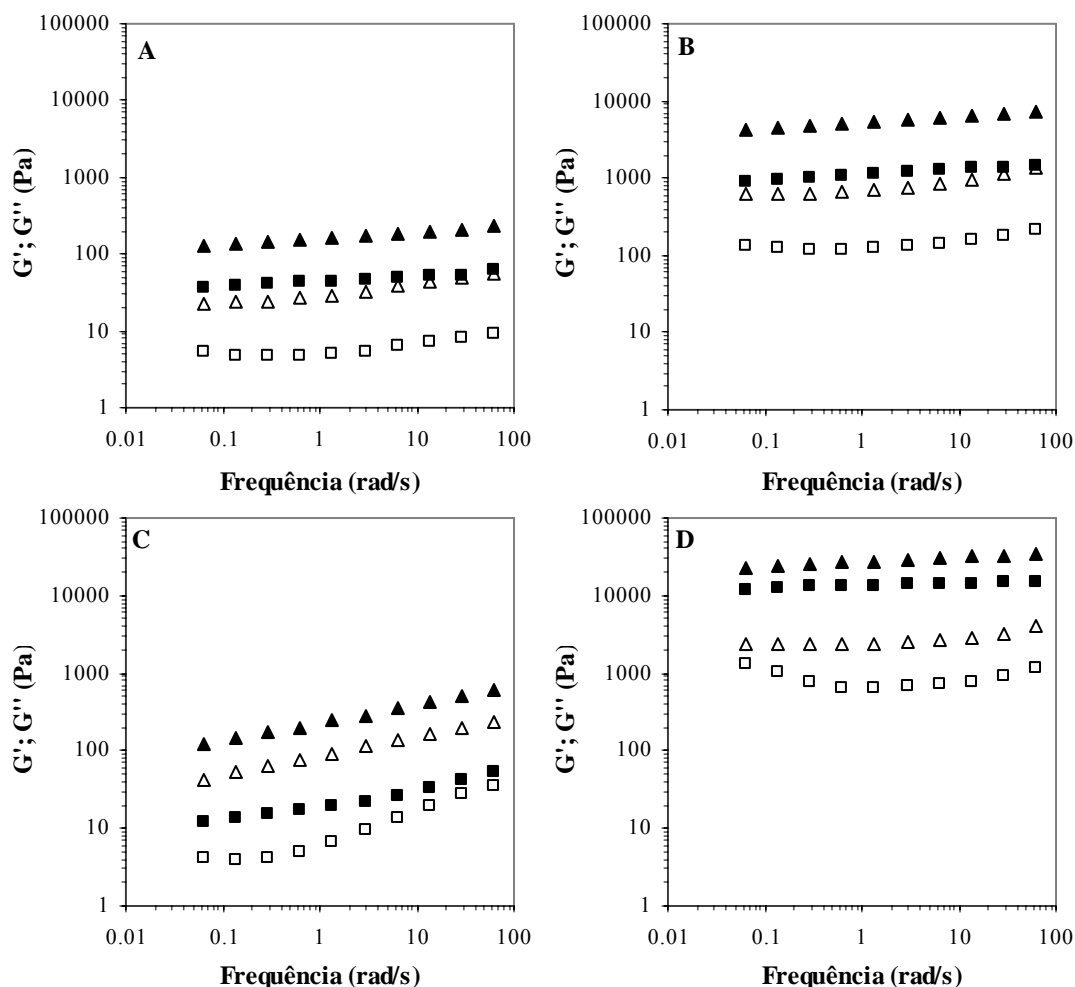
Ao diminuir a temperatura para 20°C houve um aumento dos valores de G' que permaneceram praticamente constantes até ao fim da experiência. Verificou-se também um aumento dos valores de $\tan \delta$ no caso de sistema a pH 5, enquanto que no caso o sistema a pH 7 estes valores diminuiriam. Isto reflecte a diferente estrutura de gel que os dois

sistemas apresentam, sendo o primeiro um gel granuloso e o segundo de rede tridimensional fina.

Após maturação durante 3 h a 80°C verificou-se uma dependência quer da concentração quer do valor de pH, do comportamento viscoelástico dos géis obtidos; o mesmo se passou após maturação a 20 °C (Figura 18). Para a mesma concentração de proteína o sistema a pH 5 apresentou módulos viscoelásticos muito superiores aos do sistema a pH 7. Os módulos viscoelásticos a 80°C foram sempre inferiores aos obtidos a 20°C, o que significa que ambos os sistemas evoluíram para géis mais rígidos com a diminuição da temperatura. Dentro da gama de concentrações estudadas os sistemas apresentaram predominantemente um carácter sólido, em que G' é superior ao G'' .

Para cada valor de pH um aumento da concentração de proteína traduziu-se num aumento dos módulos viscoelásticos. Os sistemas estudados a pH 5 apresentaram um comportamento viscoelástico típico de géis perfeitamente estabelecidos, para ambas as temperaturas estudadas, traduzindo-se na baixa dependência dos módulos de conservação e de perda face à variação da frequência de oscilação. Pelo contrário, o sistema a pH 7, com 13 g/dL de proteína apresentou uma variação com a frequência mais evidente, tanto a 80 como a 20°C, e valores de G' e G'' mais próximos um do outro, correspondendo a um gel pouco rígido. Para a concentração mais alta de proteína, a pH neutro, o sistema já se aproximou de um gel perfeitamente estabelecido.

Para os sistemas a pH 5 e pH 7 e para várias concentrações de proteína, analisou-se a variação de G' , obtido para uma determinada frequência num espectro mecânico após a cinética a 80°C, com a concentração de proteína (Figura 19).



(■, □) 80°C e (▲, △) 20°C .

Figura 18 - Espectros mecânicos das amostras IPSL, com diferentes concentrações de proteína, obtidos no final das cinéticas a 80°C e 20°C. (A) pH 5, proteína 5 g/dL; (B) pH5, proteína 13 g/dL; (C) pH 7, proteína 13 g/dL; (D) pH 7, proteína 18 g/dL (G' - símbolos fechados e G'' - símbolos abertos).

A análise da variação de G' com a concentração da proteína permitiu concluir que dentro da gama de concentrações estudadas o sistema a pH 7 apresentou uma dependência da concentração muito maior do que a pH 5, resultado que está em concordância com outros encontrados na bibliografia (*e. g.* Stading *et al.*, 1993). Isto denota que a pH neutro, para as concentrações de proteína estudadas o gel ainda não se encontra perfeitamente

estabelecido. À medida que a concentração foi aumentando notou-se um ligeiro abrandamento da evolução de G' com a concentração de proteína.

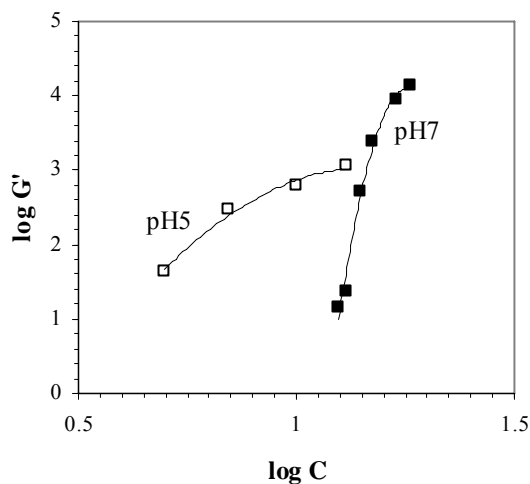


Figura 19 - Influência da concentração de proteína no módulo de conservação para dois sistemas de IPSL a diferentes pH. Os valores foram obtidos num ensaio de varrimento em frequência a 80°C, após uma cinética de 3 h a 80°C.

3.3.4. Ensaio não - isotérmicos

Para sistemas semelhantes aos anteriores analisou-se a evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura (Figura 20) durante a formação do gel.

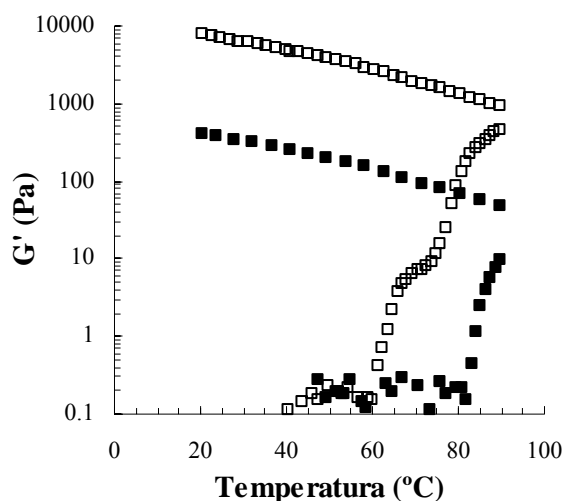


Figura 20 - Módulo de conservação (G') em função da temperatura para os sistemas de IPSL (proteína 13 g/dL); (■) pH 7 e (□) pH 5.

As amostras foram submetidas a um incremento controlado da temperatura de 40 a 90°C (1°C/min). Esta temperatura foi mantida durante 20 min e depois diminuída, à mesma taxa, até 20°C. Os módulos de conservação e de perda foram registados ao longo de toda a experiência, que se realizou a uma frequência de oscilação constante de 5 rad/s.

Verificou-se que para concentrações de proteína semelhantes a temperatura de gelificação, indicada pelo valor correspondente ao cruzamento de G' e G'' , foi menor para sistemas a pH 5 do que a pH 7 (Figura 20), sendo cerca de 62 °C para o primeiro caso e cerca de 83 °C para o segundo.

O efeito da concentração de proteína sobre a temperatura de gelificação foi igualmente diferente dependendo do pH (Figura 21). A pH 7, a influência da concentração foi notória, tanto nos valores dos módulos viscoelásticos como na temperatura de gelificação. Assim, verificou-se que uma aumento da concentração da proteína levou a um aumento dos módulos viscoelásticos e a uma diminuição da temperatura de gelificação que, para uma concentração de proteína de cerca de 12 g/dL era superior a 85°C tendo diminuído para 75°C para 17 g/dL de proteína. No entanto, a pH 5, na faixa de concentrações analisada, o efeito da concentração de proteína praticamente não influenciou a temperatura crítica à qual ocorreu a gelificação do sistema.

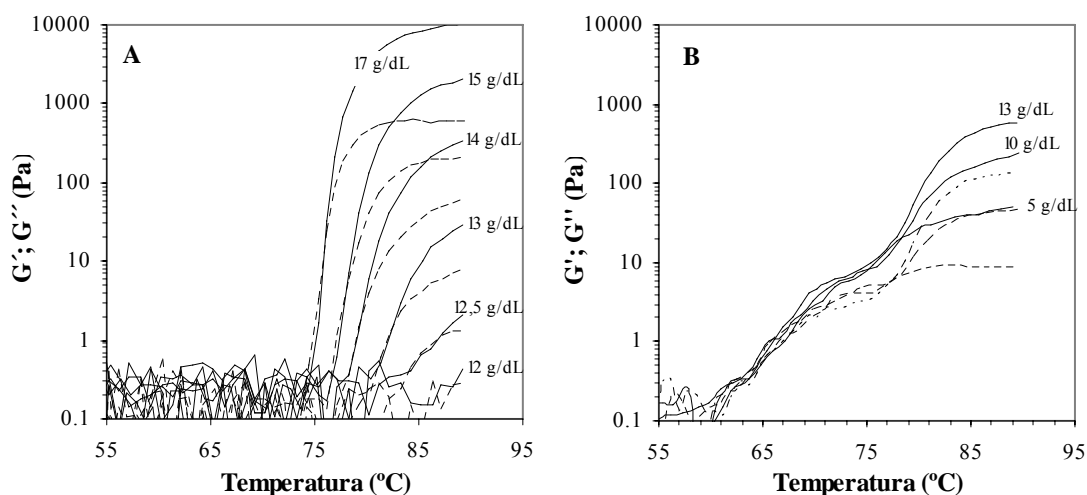


Figura 21 - Evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura, de dispersões de IPSL para várias concentrações de proteína: (A) pH7; (B) pH5.

3.3.5. Conclusões

Os resultados obtidos nas experiências efectuadas com os sistemas de IPSL a diferentes valores de pH vieram confirmar as diferenças estruturais esperadas entre os dois tipos de géis.

A pH 5 as cargas proteicas estão praticamente neutralizadas, facilitando a agregação das macromoléculas, diminuindo consequentemente a concentração mínima necessária para a gelificação do sistema e permitindo que este gelifique a uma temperatura mais baixa. No entanto estes géis mostram-se mais sensíveis à imposição de uma deformação, apesar de apresentarem maior rigidez, traduzida por módulos viscoelásticos superiores, do que os géis a pH 7.

No que respeita ao sistema a pH 7, as repulsões entre as moléculas de proteínas são maiores devido à presença das cargas negativas, acima do ponto isoeléctrico. Este facto faz com que tanto a concentração mínima necessária para a gelificação como a temperatura de gelificação aumentem.

3.4. Efeito das galactomananas na gelificação dos IPSL

3.4.1. Introdução

Nesta secção descrevem-se os resultados obtidos no estudo reológico e microscópico efectuado para avaliar o efeito da adição de um polissacarídeo neutro, uma galactomanana extraída da goma de alfarroba, na gelificação das proteínas do soro do leite a dois diferentes valores de pH, correspondentes a géis com estruturas muito diferentes: a pH 5, géis opacos de estrutura granular, e a pH 7, géis translúcidos de rede tridimensional fina. Utilizaram-se, para cada valor de pH, diferentes concentrações de PSL e de galactomanana purificada. No que respeita ao IPSL foram testadas duas concentrações de proteína, uma concentração próxima do limite mínimo para a gelificação e outra mais elevada. Assim, no caso do sistema a pH 7 a primeira foi de 11 g/dL e a segunda de 13 g/dL enquanto que para os sistemas a pH 5 testaram-se as concentrações de proteína de 5 g/dL e 13 g/dL.

3.4.2. Efeito da galactomanana a pH 7

3.4.2.1. Ensaios reológicos

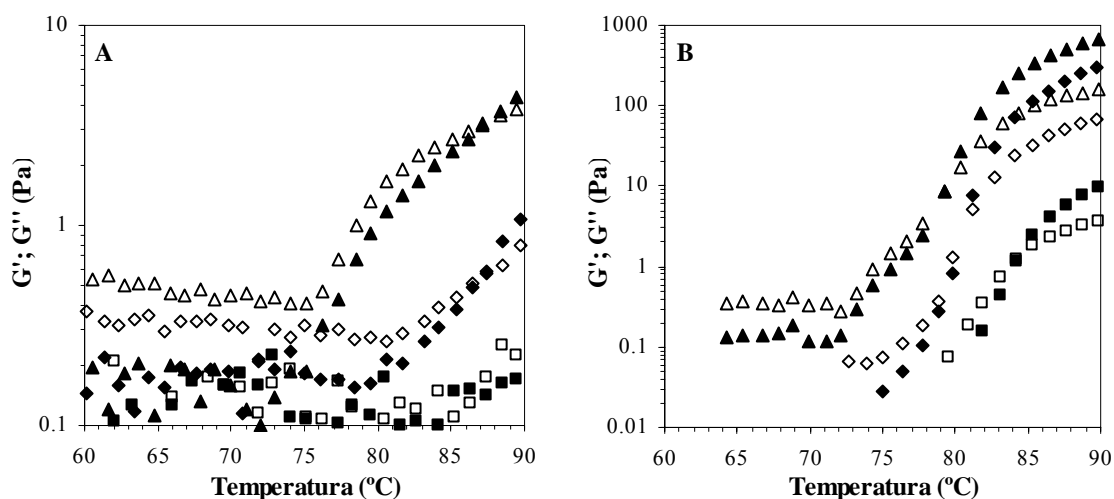
Os principais efeitos da adição de GApur no sistema de IPSL a pH 7 foram um decréscimo na temperatura de gelificação, uma diminuição da concentração crítica para a gelificação ocorrer e um aumento geral dos módulos viscoelásticos.

O efeito da adição de GA na temperatura de gelificação está ilustrado na Figura 22. Esta experiência foi realizada de modo semelhante que para os sistemas proteicos sem galactomanana, descrito na secção 3.3.4.

A Figura 22-A ilustra o efeito da adição da GApur na temperatura de gelificação das PSL a pH neutro, para uma concentração de proteína de 11 g/dL. Neste sistema a adição de GApur abaixo de 0,25 g/dL não conduziu a alterações significativas nos módulos viscoelásticos (G' e G''), comparativamente ao sistema proteico sem galactomanana, sendo que os valores destes módulos não se distinguiam do próprio sinal de ruído do instrumento. No entanto para concentrações de GApur acima de 0,25 g/dL foram observadas algumas alterações. Em relação à temperatura em que ocorreu o cruzamento dos dois módulos viscoelásticos não se observou um grande efeito da concentração da galactomanana. No entanto este efeito foi claramente evidente no que respeita aos valores de G' e G'' , que aumentaram com o aumento da concentração do polissacarídeo adicionado ao sistema.

Para uma concentração de proteína de 13 g/dL (Figura 22-B) a adição da GApur resultou num incremento dos módulos viscoelásticos, em relação ao sistema de IPSL sem galactomanana, e também uma diminuição da temperatura de gelificação. Para esta concentração de proteína a adição de 0,21 g/dL e 0,41 g/dL de GApur fez diminuir a temperatura de gelificação em cerca de 4 e 6 °C, respectivamente.

A inspecção visual dos géis formados por IPSL + GApur revelou que estes eram todos translúcidos, no entanto a sua turbidez foi aumentando à medida que a concentração de galactomanana adicionada aumentava.

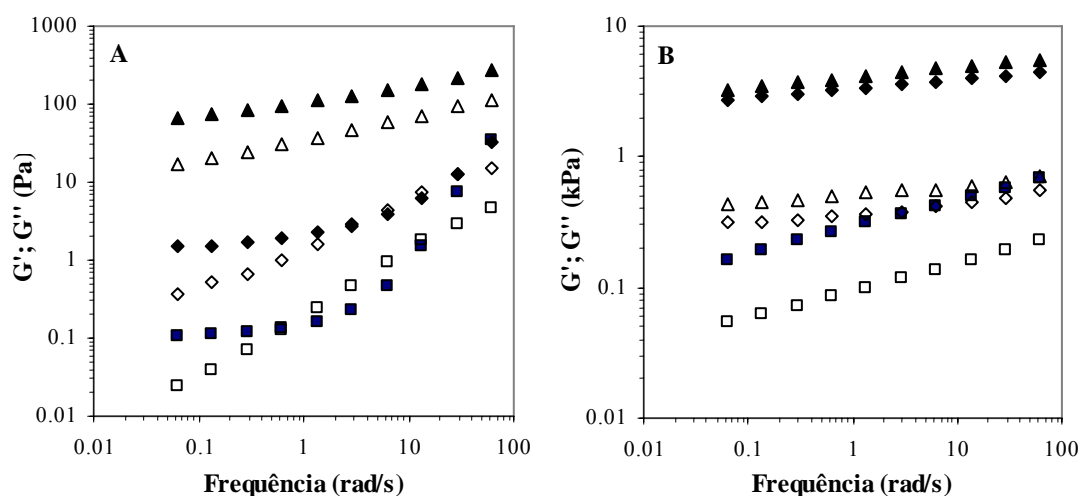


(A): (■, □) GAPur 0,25 g/dL; (◆, ◇) GAPur 0,31 g/dL; (▲, △) GAPur 0,41 g/dL
 (B): (■, □) GAPur 0 g/dL; (◆, ◇) GAPur 0,21 g/dL ; (▲, △) GAPur 0,41 g/dL

Figura 22 - Dependência da temperatura do módulo de conservação - G' (símbolos a cheio) e do módulo de perda - G'' (símbolos abertos) dos sistemas IP SL + GAPur (A - proteína 11 g/dL, B - proteína 13 g/dL) a pH 7, aquecidos de 40 a 90°C (5 rad/s, 1°C/min).

Após arrefecimento até 20°C (como descrito em § 3.3.4) o efeito da adição de galactomanana no comportamento viscoelástico do gel formado foi analisado por observação dos ensaios oscilatórios de varrimentos em frequência. A Figura 23 mostra os espectros mecânicos obtidos para o gel de IP SL e para os géis mistos IP SL + GAPur. A análise destes espectros permitiu observar que a uma concentração proteica de 11 g/dL o IP SL, após ter sido submetido a uma temperatura de 90°C, na qual se manteve durante 20 min, apresentou depois de arrefecido um comportamento viscoelástico característico de um gel muito frágil em que G' tende a ser menos dependente da frequência para valores de frequência baixos e cruza-se com G'' por duas vezes, a baixas e altas frequências de oscilação.

O efeito da adição da galactomanana foi semelhante para as duas concentrações de proteína estudadas. Este efeito traduziu-se num aumento generalizado dos módulos viscoelásticos, uma diminuição da dependência destes módulos face à frequência de oscilação e, no caso das misturas com 11 g/dL de proteína, a gelificação do sistema proteico.



(A): (■, □) GAPur 0 g/L; (◆, ◇) GAPur 0,25 g/dL; (▲, △) GAPur 0,41 g/dL

(B): (■, □) GAPur 0 g/L; (◆, ◇) GAPur 0,21 g/dL de; (▲, △) GAPur 0,41 g/dL

Figura 23 - Espectros mecânicos para sistemas de IP SL, proteína 11 g/dL (A) e 13 g/dL (B) + GAPur, a pH7, obtidos a 20°C após as experiências não isotérmicas.

As cinéticas de maturação dos géis de IP SL - GAPur vieram confirmar alguns dos efeitos já verificados nos ensaios não isotérmicos. A Figura 24-A apresenta a cinética de maturação a 80°C do sistema de IP SL sem galactomanana (com 11 g/dL de proteína). Nesta figura é possível observar que os valores do módulo de conservação e da tangente ao ângulo de perda têm uma distribuição ao longo do tempo muito irregular e estão próximos do ruído do instrumento. A adição de 0,25 g/dL de GAPur provocou um aumento de G' em relação ao sistema sem galactomanana sendo já possível neste caso (Figura 24-B) observar uma ligeira tendência para um aumento deste módulo com o decorrer da experiência.

Na Figura 24-C pode-se observar que tanto o módulo de conservação como tangente ao ângulo de perda apresentaram uma variação ao longo do tempo, muito bem definida com um aumento gradual do primeiro e um decréscimo gradual do segundo à medida que decorria a experiência. Os módulos de perda e de conservação só se cruzaram no final da experiência, como pode ser observado pelo valor de $\tan \delta$ próximo de 1, significando que para esta concentração de proteína, numa cinética de 3 h o carácter viscoso da amostra prevaleceu.

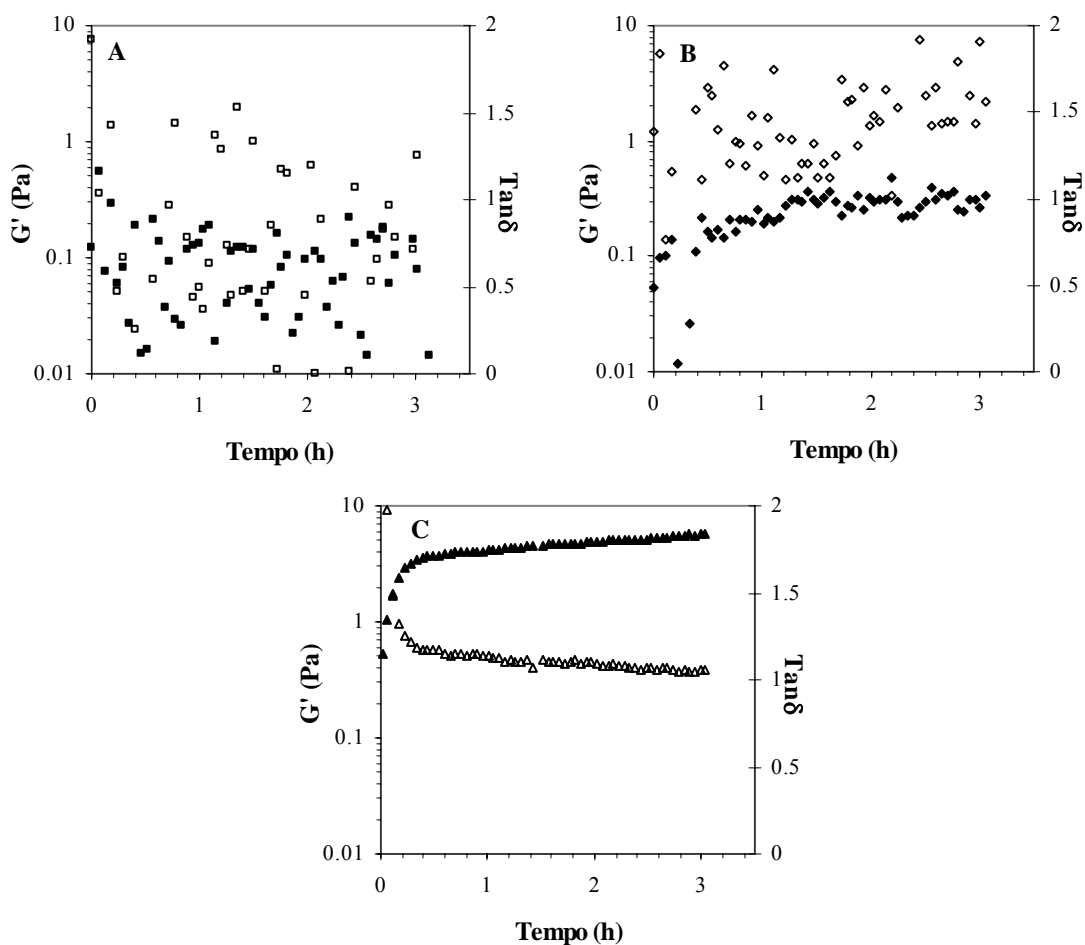
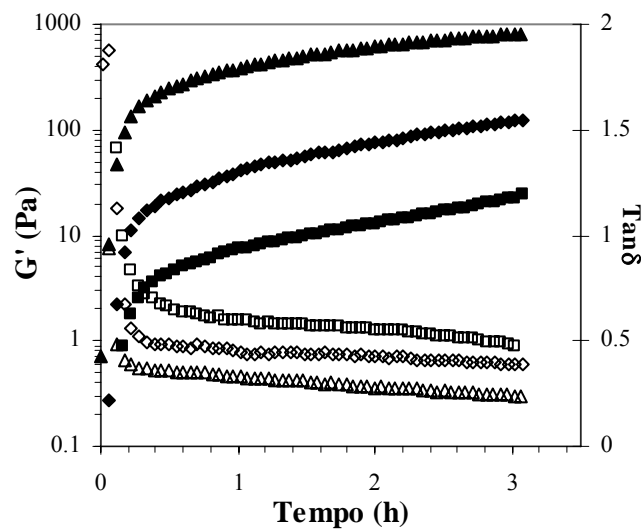


Figura 24 - Variação do módulo de conservação (símbolos a cheio) e da tangente ao ângulo de perda (símbolos abertos) durante as experiências de cura a 80°C para sistemas IPSL (proteína 11 g/dL) + GAPur, a pH7: (A) GAPur 0 g/L; (B) GAPur 0,25 g/dL; (C) GAPur 0,41 g/dL

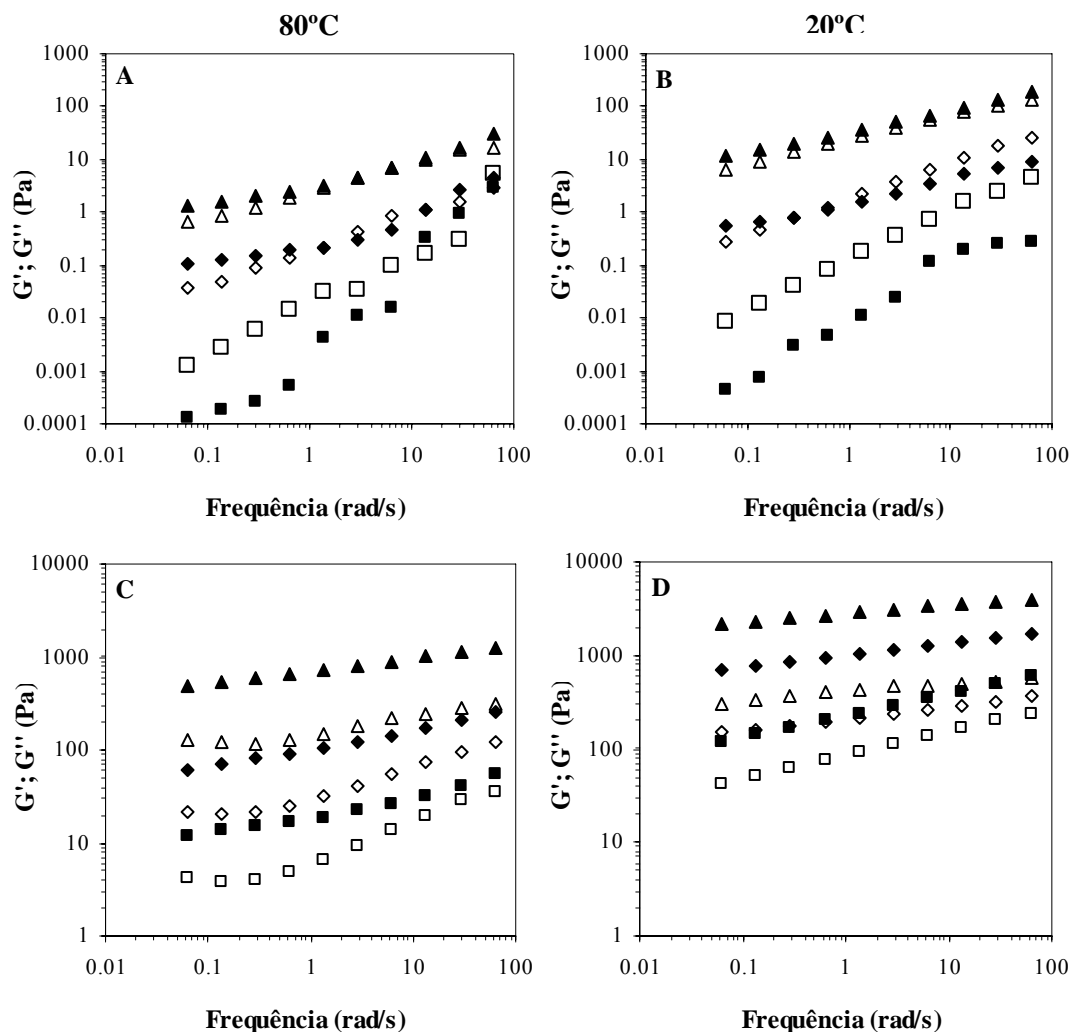
Para uma concentração de proteína de 13 g/dL (Figura 25) estávamos já perante um sistema que gelificava nos primeiros minutos (o cruzamento de G' com G'' deu-se ao fim de cerca de 20 min) mesmo sem adição de galactomanana. A adição da goma de alfarroba purificada, aos sistemas proteicos a pH 7 e dentro da gama de concentrações estudada, provocou um aumento dos módulos viscoelásticos e a diminuição da tangente ao ângulo de perda das misturas e reduziu o tempo em que os módulos viscoelásticos se cruzaram.



(■, □) GAPur 0 g/L; (◆, ◇) GAPur 0,20 g/dL; (▲, △) GAPur 0,50 g/dL

Figura 25 - Variação do módulo de conservação (símbolos a cheio) e da tangente ao ângulo de perda (símbolos abertos) durante as experiências de cura a 80°C para sistemas IPSL (proteína 13 g/dL) + GAPur, a pH7.

Foram também obtidos os espectros mecânicos para os vários sistemas IPSL-GAPur efectuando varrimentos em frequência no final das cinéticas a 80 °C e após ter mantido os sistemas a 20 °C durante 2 h (Figura 26).



(A e B): (■, □) GAPur 0 g/L; (◆, ◇) GAPur 0,25 g/dL; (▲, △) GAPur 0,41 g/dL

(C e D): (■, □) GAPur 0 g/L; (◆, ◇) GAPur 0,21 g/dL de; (▲, △) GAPur 0,41 g/dL

Figura 26 - Espectros mecânicos para sistemas de IP SL, proteína 11 g/dL (A e B) e 13 g/dL (C e D) + GAPur, a pH7, obtidos a 20°C após as experiências não isotérmicas (G' símbolos a cheio; G'' símbolos abertos)

No que respeita aos sistemas com 11 g/dL de proteína observaram-se diferenças marcantes entre os espectros mecânicos realizados a temperaturas diferentes. A 80°C o comportamento do IP SL sem galactomanana foi o de um fluido viscoelástico com concentração abaixo da transição sol-gel, em que G' e G'' eram muito dependentes da frequência e se cruzavam para frequências altas. Para uma temperatura de 20°C, apesar de

os valores de ambos os módulos viscoelásticos serem mais elevados do que a 80°C, G'' foi sempre superior a G' e a dependência de ambos os módulos com a frequência foi semelhante até aproximadamente 6 rad/s, altura em que G' passou a estar menos dependente da frequência. A adição da GApur provocou um aumento dos módulos viscoelásticos do sistema proteico e a diminuição da dependência destes face à variação da frequência. No entanto mesmo com a diminuição da temperatura para 20°C estávamos perante um sistema ainda muito próximo da transição sol-gel, mesmo com a adição de cerca de 0,4 g/dL de galactomanana. Para uma concentração de proteína de 13 g/dL, durante a experiência de varrimento em frequência o módulo de conservação foi sempre superior ao módulo de perda e a sua dependência da frequência foi menos pronunciada. Esta dependência diminuiu com a adição da GA.

3.4.2.2. *Microscopia confocal de varrimento laser*

As amostras de IPSL e de misturas IPSL/GA foram analisadas por microscopia confocal de varrimento de laser, após serem sujeitas a um tratamento térmico semelhante ao utilizado nos ensaios reológicos de varrimento em temperatura. Às amostras foi adicionada rodamina B o que permitiu marcar a proteína, enquanto que o polissacarídeo permaneceu sem fluorescência. A Figura 27 mostra as imagens obtidas por CLSM onde as zonas claras correspondem à matriz proteica e as zonas escuras às cadeias de polissacarídeo.

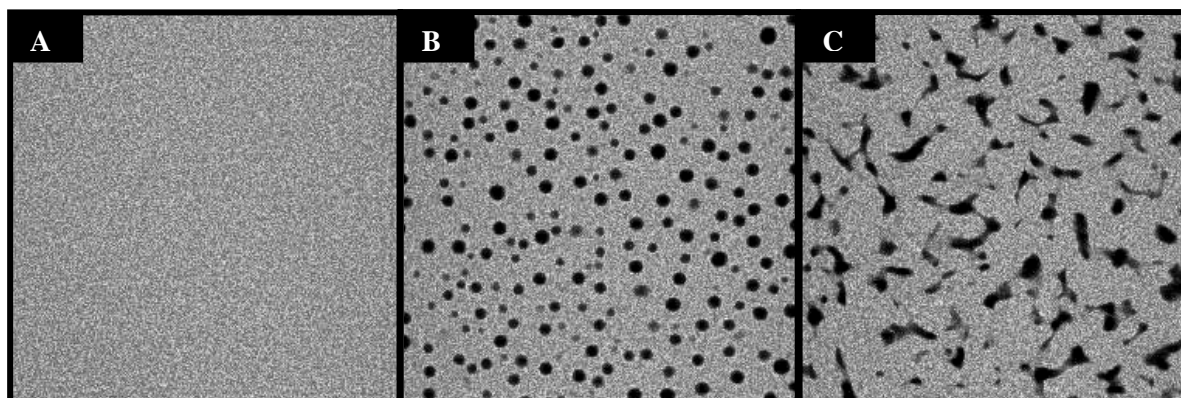


Figura 27 - Imagens de CLSM para IPSL com 13 g/dL de proteína (A); sem galactomanana; (B) IPSL + 0,2 g/dL de GApur e (C) IPSL+ 0,8 g/dL de GApur

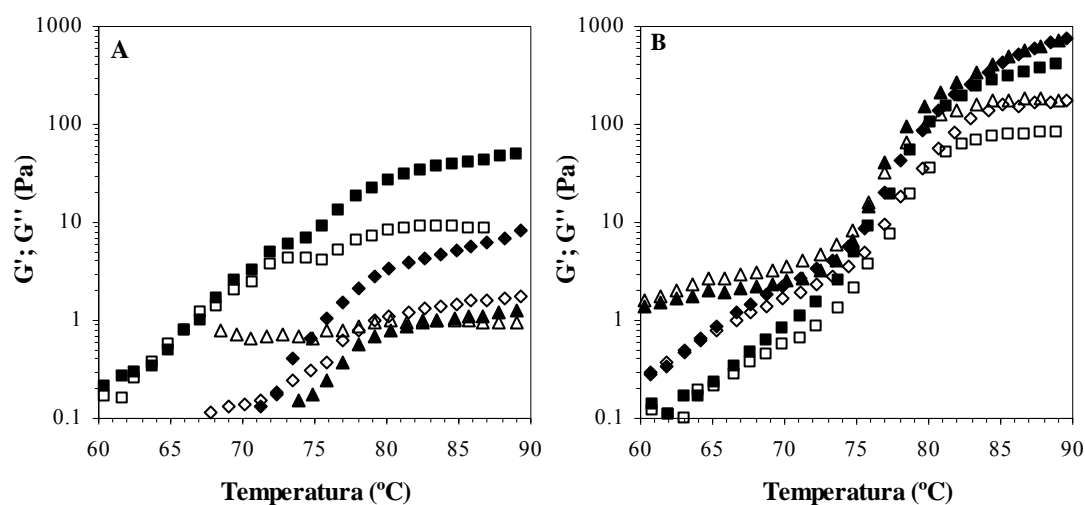
A análise microestrutural revelou sistemas com separação de fases em que a fase dispersa, sem proteína, formou umas pequenas gotas esféricas, quando a concentração de galactomanana era mais baixa. O tamanho destas gotas foi crescendo à medida que a concentração de galactomanana adicionada aumentou, correspondendo a um aumento da rigidez dos géis. O facto de a concentração de polissacarídeo aumentar corresponder a um aumento do carácter elástico dos sistemas poderá estar relacionado com um aumento dos fenómenos segregativos originados pela incompatibilidade termodinâmica entre os dois biopolímeros. Lembremo-nos que para este valor de pH a macromolécula de proteína exhibe algumas cargas negativas enquanto que a galactomanana é neutra. Nestas condições poderá ocorrer uma separação de fases onde a rede proteica forma uma fase contínua que acomoda as cadeias de polissacarídeo. As consequências destes acontecimentos – segregação dos biopolímeros e aumento localizado da concentração de cada um deles – foram a diminuição da concentração crítica para a gelificação, o aumento da rigidez do gel e a diminuição da temperatura de gelificação.

3.4.3. Efeito da galactomanana a pH 5

3.4.3.1. Ensaios reológicos

No que respeita aos sistemas a pH 5 o efeito da presença da galactomanana foi diverso do sistema anterior. Neste caso a presença da goma de alfarroba purificada teve um efeito diversificado, dependendo da concentração de proteína no sistema (Figura 28). Assim para uma concentração de proteína de 5 g/dL a adição da GApur teve um efeito negativo no desenvolvimento do gel. À medida que esta concentração foi aumentando o efeito da galactomanana foi-se tornando menos pronunciado chegando mesmo a ser ligeiramente positivo, como aconteceu para uma concentração de proteína de 13 g/dL.

O efeito da adição da galactomanana na temperatura de gelificação também foi diverso. Para os sistemas com 5 g/dL de proteína o aumento da concentração de polissacarídeo adicionado, dentro da gama de concentrações estudada, provocou um aumento da temperatura de gelificação enquanto que para o sistema com 13 g/dL de proteína verificou-se o efeito contrário.



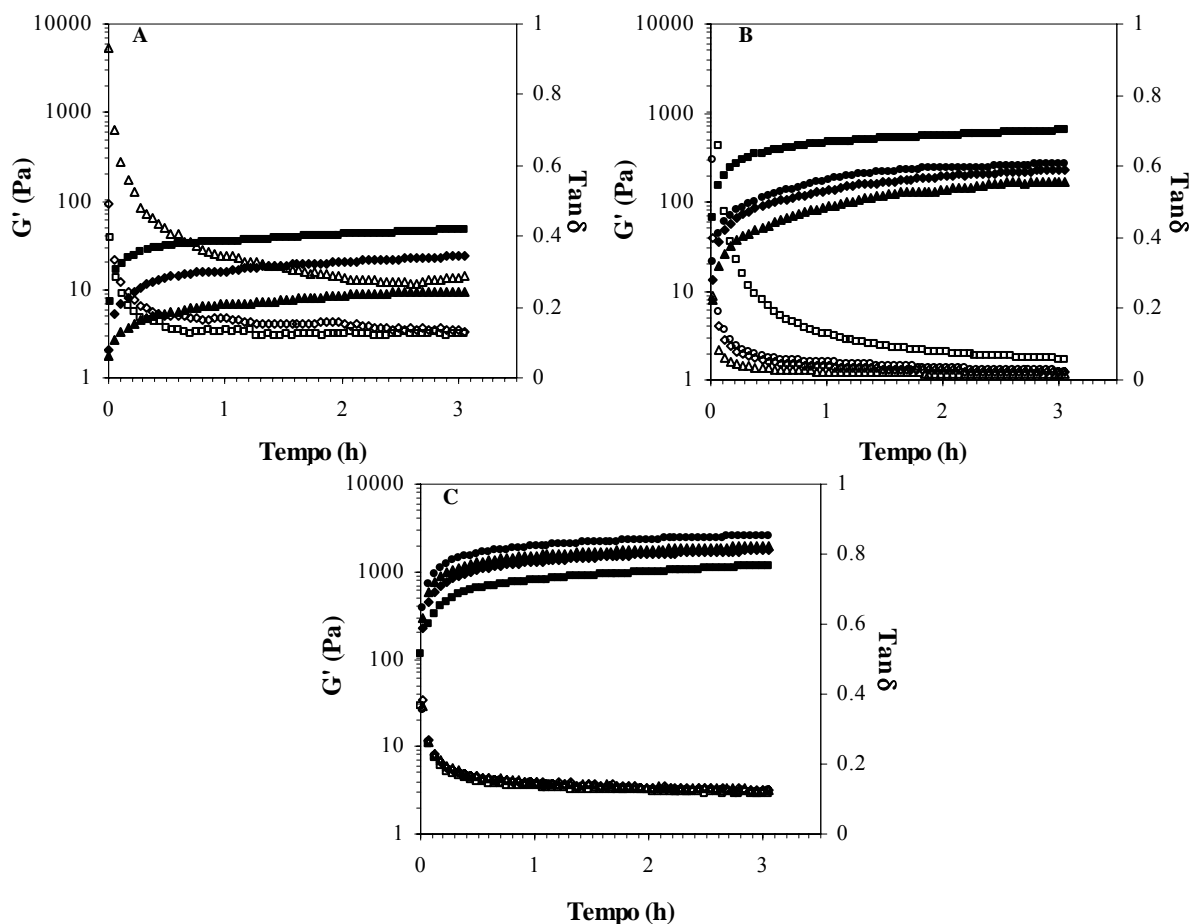
(A): (■, □) GApur 0 g/dL; (◆, ◇) GApur 0,14 g/dL; (▲, △) GApur 0,50 g/dL

(B): (■, □) GApur 0 g/dL; (◆, ◇) GApur 0,25 g/dL; (▲, △) GApur 0,40 g/dL

Figura 28 - Dependência da temperatura do módulo elástico- G' (símbolos a cheio) e do módulo viscoso- G'' (símbolos abertos) dos sistemas IPSL + GApur (A - proteína 5 g/dL, B - proteína 13 g/dL), a pH 5, aquecidos de 40 a 90°C (5 rad/s, 1°C/min).

A partir de ensaios isotérmicos de maturação, a pH 5, verificou-se novamente um efeito negativo, com uma diminuição da rigidez do gel e um carácter viscoso mais elevado, quando a concentração de proteína era baixa (Figura 29-A, para 5 g/dL de proteína), enquanto que para valores de concentração proteica mais elevados o efeito revertia-se (Figura 29-C, para 13 g/dL de proteína). Contudo o carácter elástico de todos os sistemas analisados foi sempre superior ao seu carácter viscoso, como se pode verificar pelos valores de $\tan \delta$ sempre inferiores à unidade.

No caso do sistema com 10 g/dL de proteína verificou-se que a adição de galactomanana teve sempre um efeito negativo, no entanto o efeito da adição de 0,25 g/dL de GApur foi intermédio das restantes concentrações analisadas. Pensa-se que a esta concentração de proteína já estaremos numa espécie de transição entre um efeito negativo e um efeito positivo da galactomanana no carácter viscoelástico do sistema proteico.

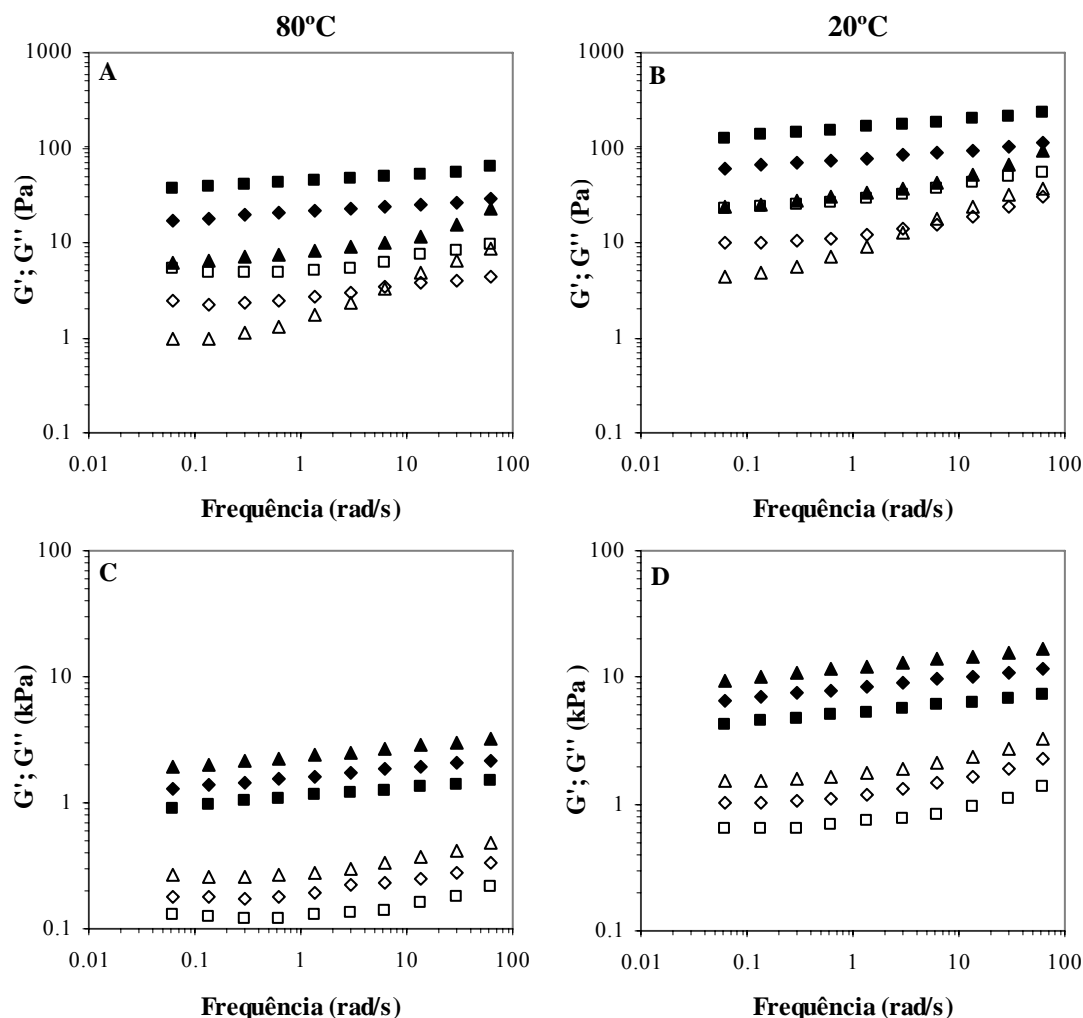


(A): (■, □) GAPur 0 g/dL; (◆, ◇) GAPur 0,1 g/dL de; (▲, △) GAPur 0,5 g/dL
 (B): (■, □) GAPur 0 g/dL; (◆, ◇) GAPur 0,25 g/dL; (▲, △) GAPur 0,3 g/dL e (●, ○) GAPur 0,5 g/dL
 (C): (■, □) GAPur 0 g/dL; (◆, ◇) GAPur 0,25 g/dL; (▲, △) GAPur 0,3 g/dL e (●, ○) GAPur 0,4 g/dL

Figura 29 - Variações iniciais nos módulos viscoelásticos (G' -símbolos a cheio e G'' -símbolos abertos) durante as experiências de cura a 80°C para os sistemas IP SL+GAPur (A – proteína 5g/dL, B - proteína 10 g/dL, C - proteína 13 g/dL), a pH 5.

À semelhança dos sistemas a pH 7 foram obtidos os espectros mecânicos para os vários sistemas IP SL-GAPur estudados a pH 5 efectuando varrimentos em frequência no final das cinéticas a 80 °C e após ter mantido os sistemas a 20 °C durante 2 h (Figura 30).

Em qualquer das misturas estudadas verificou-se sempre que G' era superior a G'' , dentro da gama de frequências analisada, e que ambos os módulos evidenciavam pouca dependência da frequência de oscilação. Novamente aqui o carácter elástico de todas as misturas aumentou com a diminuição da temperatura. O efeito da adição da galactomanana foi semelhante ao observado nas cinéticas de maturação dos géis.



(A e B) – proteína 5,0 g/dL – (■, □) 0 g/dL GA pur; (◆, ◇) 0,10 g/dL GA pur; (▲, △) 0,50 g/dL GA pur
(C e D) – proteína 13 g/dL – (■, □) 0 g/dL GA pur; (◆, ◇) 0,25 g/dL GA pur; (▲, △) 0,40 g/dL GA pur

Figura 30 - Espectros mecânicos para sistemas de IP SL + GA pur a pH5, obtidos após uma cinética a 80°C (coluna da esquerda) e uma cinética a 20°C (coluna da direita): módulo de conservação – símbolos a cheio; módulo de perda – símbolos abertos.

3.4.3.2. Microscopia electrónica de varrimento

As Figuras 31 e 32 mostram as imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento dos géis obtidos e preparados de acordo com o descrito em § 2.6.1. Nestas imagens pode observar-se a microestrutura dos géis granulosos obtidos por um aquecimento muito rápido a 90°C de dispersões de IP SL, a pH 5, com e sem goma de alfarroba purificada. Os géis obtidos eram opacos e tinham uma cor esbranquiçada.

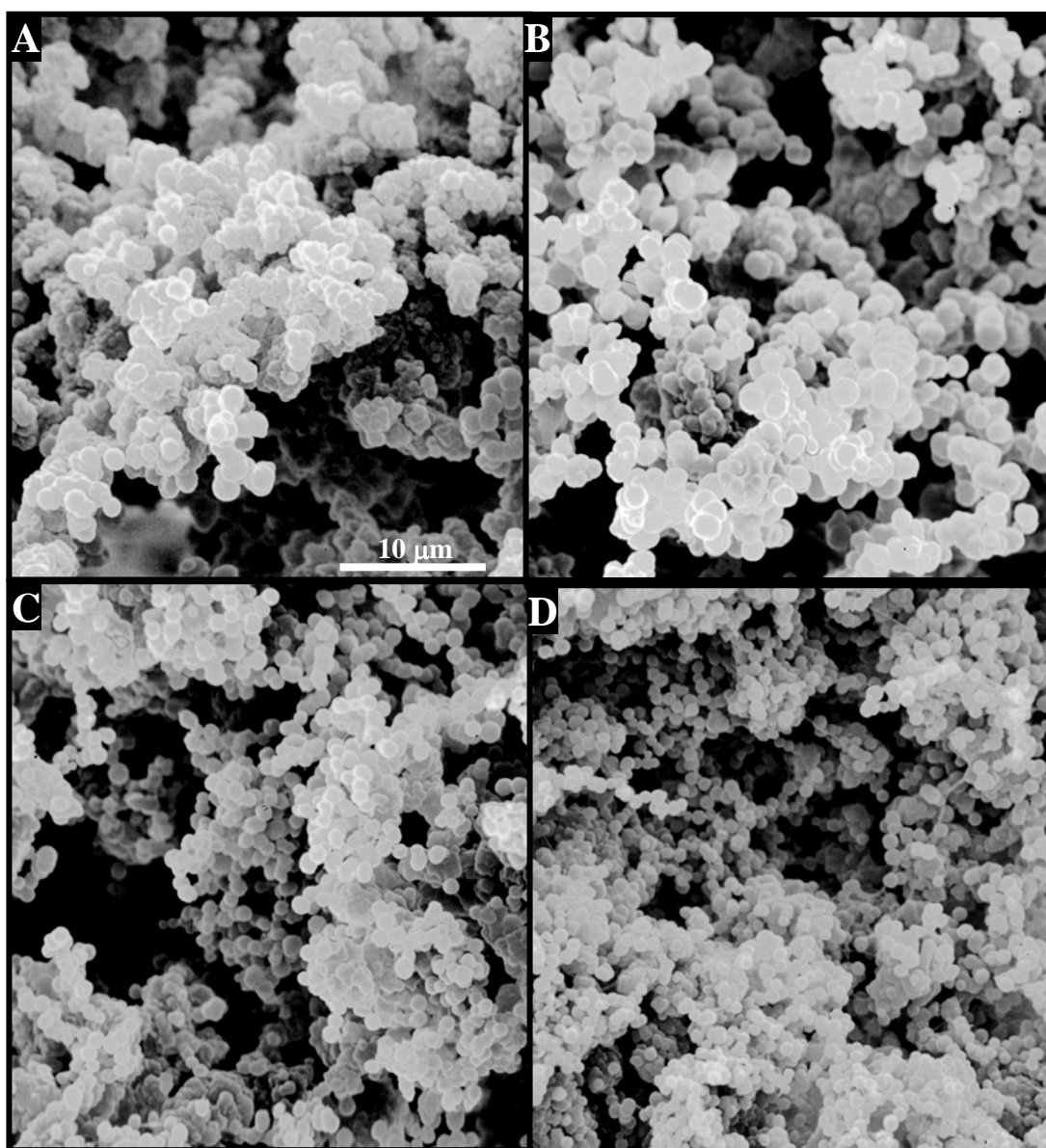


Figura 31 - Imagens de SEM de géis de IPSL, proteína 8 g/dL a pH5: (A) sem galactomanana; (B) GApur 0,1 g/dL; (C) GApur 0,2 g/dL e (D) GApur 0,4 g/dL (ampliação x2000)

As partículas brancas que se podem observar nas fotografias correspondem às moléculas de proteína, que formam extensos agregados. O tamanho destas partículas era muito semelhante, dentro da mesma amostra, e a sua forma praticamente esférica, embora algumas parecessem estar quase fundidas umas nas outras. Com a adição da galactomanana verificou-se que o tamanho das partículas de proteína foi-se reduzindo e que as partículas tornaram-se mais individualizadas. Para além disso observou-se o

aparecimento de pequenos fios a interligar os agregados proteicos, os quais se atribuem às cadeias de polissacarídeo (como se evidencia na Figura 32).

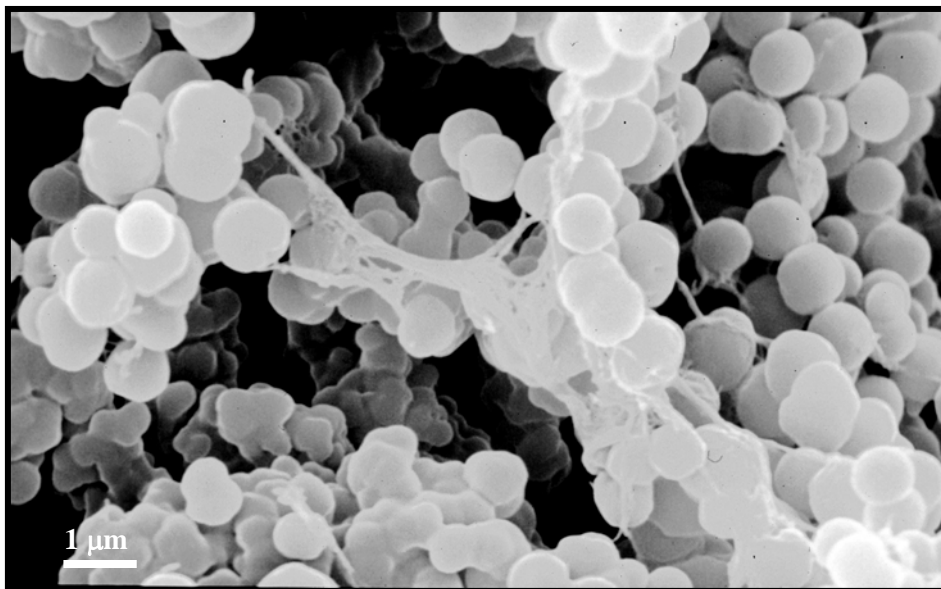


Figura 32 - Imagens de SEM do gel de IPSL, proteína 8 g/dL + GApur 0,4 g/dL a pH5 (ampliação x10000).

3.4.4. Conclusões

Para a gama de concentrações analisada, a pH 7 a amostra de GApur teve na generalidade um efeito positivo na formação do gel de IPSL. O facto de a concentração de polissacarídeo aumentar corresponder a um aumento do carácter elástico dos sistemas proteicos poderá estar relacionado com uma aumento dos fenómenos segregativos originados pela incompatibilidade termodinâmica entre os dois biopolímeros. Lembremos que para este valor de pH a macromolécula de proteína exibe algumas cargas negativas enquanto que a galactomanana é neutra. Nestas condições poderá ocorrer uma separação de fases onde a rede proteica forma uma fase contínua que acomoda as cadeias de polissacarídeo. As consequências destes acontecimentos – segregação dos biopolímeros e aumento localizado da concentração de cada um deles – foram a diminuição da concentração crítica para a gelificação, o aumento da rigidez do gel e a diminuição da temperatura de gelificação. Este tipo de comportamento já foi descrito para outros sistemas mistos de PSL/polissacarídeos (Zasytkin *et al*, 1996; Bryant & Clements, 2000 Beaulieu

et al, 2001), bem como para sistemas mistos de polissacarídeos gelificantes/não-gelificantes (Lopes da Silva *et al*, 1996).

No caso dos sistemas a pH 5, o facto de se verificar um efeito diverso está directamente relacionado com os mecanismos de construção da rede de gel, ou seja com os mecanismos de gelificação. Nestas condições o gel proteico é constituído por grandes agregados, formando uma estrutura com poros maiores. Quando a concentração de proteína é baixa, as cadeias de galactomanana impedem as interacções entre as moléculas proteicas impedindo a formação do gel. Neste sistemas o efeito de enchimento dos poros do gel por parte do polissacarídeo, com o consequente melhoramento das propriedades mecânicas, só se verifica para concentrações mais altas de proteína.

3.5. Efeito do grau de ramificação das galactomananas na gelificação dos IPSL a pH 7

3.5.1. Introdução

Depois de saber que as galactomananas exerciam diversos efeitos sobre os processos de gelificação das PSL, o segundo objectivo principal deste trabalho foi investigar se as características estruturais das cadeias de galactomananas tinham influência nesse efeito, particularmente, o grau de ramificação.

Com este objectivo em vista realizaram-se mais uma série de experiências em que se tentou analisar mais especificamente qual era a influência do grau de ramificação das galactomananas. Para isso utilizaram-se diversas amostras, com diferentes origens e processos de obtenção, abrangendo uma gama de razões man/gal entre 1,5 e 3,7.

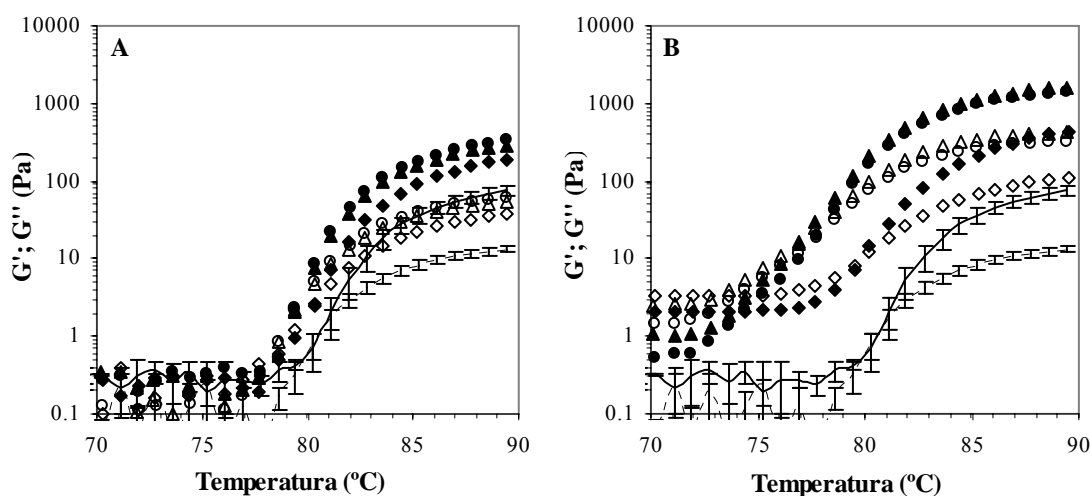
As amostras de polissacarídeos testadas tiveram origem em farinhas de alfarroba, guar e tara e foram preparadas a partir das gomas purificadas por tratamento enzimático com α -galactosidase. Esta enzima corta as ligações α -(1 \rightarrow 6) entre resíduos de manose da cadeia macromolecular principal e os resíduos de galactose que se encontram distribuídos ao longo desta cadeia.

Dentro das amostras de galactomananas que se possuía utilizaram-se para estudar o efeito do grau de ramificação as amostras GA0H, GT0H, GG0H, GG6H e GG12H.

3.5.2. Comportamento viscoelástico durante a formação do gel

Foram realizados ensaios de varrimento de temperatura para sistemas a pH 7 de várias misturas de IPSL/galactomananas.

Em primeiro lugar compararam-se as galactomananas provenientes de diferentes sementes. A Figura 33 mostra os módulos viscoelásticos em função da temperatura, para as dispersões de IPSL com 13 g/dL de proteína e com duas concentrações distintas de GA0H, GG0H e GT0H, 0,2 e 0,6 g/dL. As curvas têm uma forma semelhante em que no início da rampa ascendente de temperatura o valor do módulo de conservação é muito pequeno e pouco se distingue do ruído do instrumento. A partir de uma determinada temperatura ambos os módulos aumentaram, embora G' aumentasse mais rapidamente que G'' . Nestas condições verificou-se que o efeito destes polissacarídeos, dentro da gama de concentrações estudadas, era no sentido do favorecimento da construção do gel, o que se traduziu em módulos viscoelásticos superiores aos dos sistemas de IPSL sozinhos e em temperaturas de gelificação mais baixas.



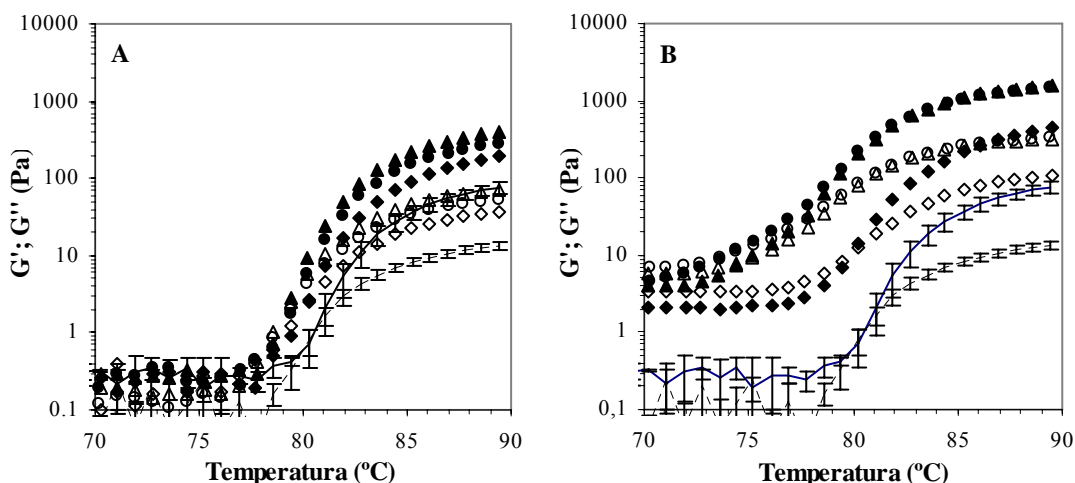
(◆,◇) GG0H; (▲,△) GT0H e (●,○) GA0H
As linhas correspondem aos sistemas de IPSL sem galactomanana.

Figura 33 - Evolução dos módulos viscoelásticos (G' - símbolos cheios e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada) em função da temperatura para sistemas de IPSL/galactomanana (concentração de proteína de 13 g/dL), a pH 7: (A) 0,2 g/dL de galactomanana; (B) 0,6 g/dL de galactomanana.

Aqui foi possível distinguir a amostra guar das restantes. Verificou-se que a galactomanana com um maior grau de ramificação tinha um efeito muito menos

pronunciado do que das restantes galactomananas, enquanto que o efeito das amostras de GA0H e GT0H era muito semelhante entre si. Sabe-se que as cadeias de galactomananas de maior massa molecular têm um efeito mais pronunciado na gelificação do IPSL (Monteiro *et al.*, 2005), no entanto, aqui o efeito do grau de ramificação parece ter sido superior, pois embora a GG0H tenha uma massa molecular superior à das restantes amostras o seu efeito na gelificação do IPSL foi inferior.

A influência do grau de ramificação foi confirmada ao comparar-se as amostras de guar com diferentes razões man/gal, obtidas por hidrólise com α -galactosidase (Figura 34). Neste caso o efeito da GG0H (man/gal = 1,5) foi novamente muito inferior ao das amostras de GG6H e GG12H, com massas moleculares muito semelhantes e graus de ramificação muito distintos, 2,3 e 3,7 respectivamente.



(◆,◇) GG0H; (▲,△) GG6H e (●,○) GG12H

As linhas correspondem aos sistemas de IPSL sem galactomanana.

Figura 34 - Evolução dos módulos viscoelásticos (G' - símbolos cheios e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada) em função da temperatura para sistemas de IPSL/goma de guar (concentração de proteína de 13 g/dL), a pH 7: (A) 0,2 g/dL de guar; (B) 0,6 g/dL de guar.

Estes efeitos diversos foram notórios quer nos valores dos módulos viscoelásticos, quer nos valores das temperaturas de gelificação (Figura 35). A temperatura de gelificação do sistema de IPSL sem galactomanana foi de cerca de 80°C. Para as concentrações mais baixas de galactomanana, a influência da razão man/gal foi pouco evidente mas deixava perceber que as amostras com menor grau de ramificação

provocavam uma diminuição na temperatura de gelificação e tinham um efeito positivo mais pronunciado nos valores dos módulos viscoelásticos. Para concentrações mais elevadas de galactomanana a diminuição da temperatura de gelificação em função do aumento da razão man/gal tornou-se mais evidente, especialmente para as amostras de guar modificado. Isto poderá ser consequência da sua elevada massa molecular.

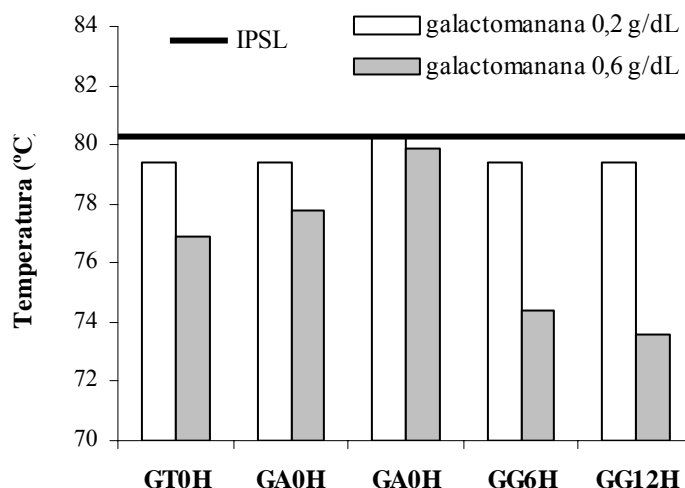
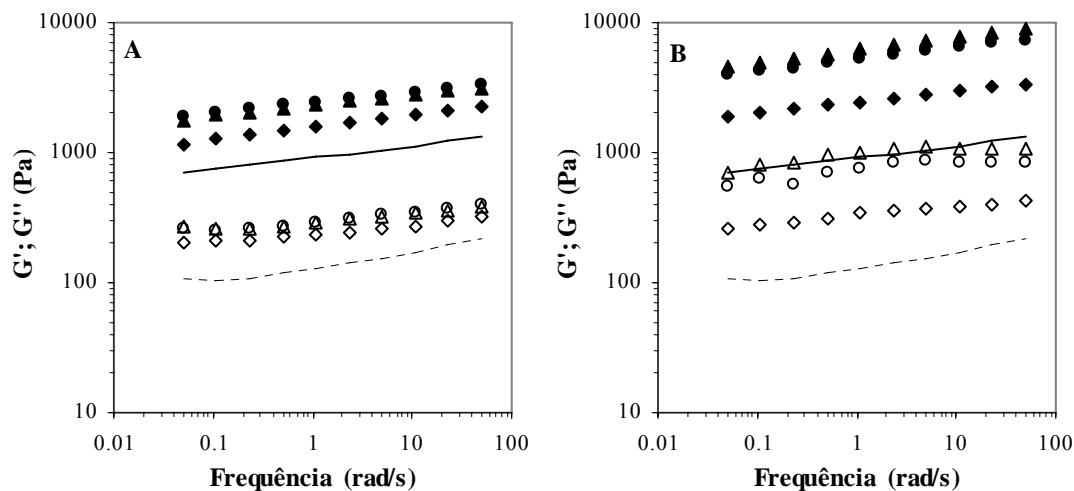


Figura 35 – Temperaturas de gelificação para os sistemas IPSL/galactomanana (concentração de proteína 13 g/dL, pH 7).

3.5.3. Comportamento viscoelástico dos géis formados

Foram obtidos os espectros mecânicos das misturas IPSL/galactomananas no final das rampas descendentes de temperatura de 90 para 20 °C (Figuras 36 e 37). O comportamento viscoelástico observado foi semelhante para todas as amostras, correspondendo ao comportamento de géis perfeitamente estabelecidos.

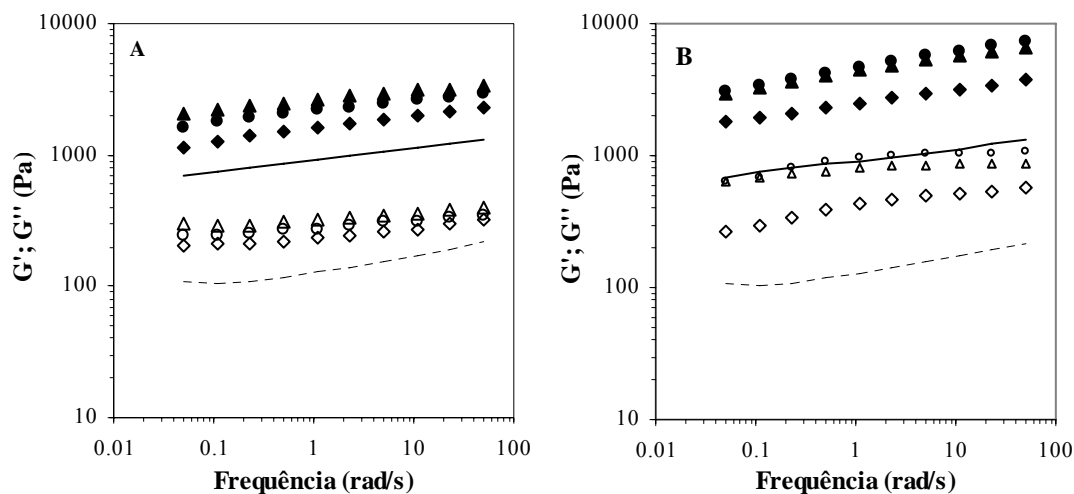
Para ambas as concentrações de galactomanana estudadas o efeito da adição destes polissacarídeos foi o de aumentar a rigidez do gel, o que se traduz num aumento de G' em relação ao sistema proteico sozinho. Este efeito foi menos pronunciado para as galactomananas com maior grau de ramificação. De entre as várias amostras estudadas, todas apresentaram um efeito semelhante excepto a de GG0H para a qual se observou um efeito claramente inferior ao das restantes amostras.



(◆,◇) GG0H; (▲,△) GT0H e (●,○) GA0H

As linhas correspondem aos sistemas de IP SL sem galactomanana.

Figura 36 – Espectros mecânicos (G' - símbolos cheios e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada), a 20 °C, dos sistemas de IP SL/galactomanana (concentração de proteína de 13 g/dL), a pH 7: (A) 0,2 g/dL de galactomanana; (B) 0,6 g/dL de galactomanana.



(◆,◇) GG0H; (▲,△) GG6H e (●,○) GG12H

As linhas correspondem aos sistemas de IP SL sem galactomanana.

Figura 37 - Evolução dos módulos viscoelásticos (G' - símbolos cheios e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada), a 20 °C, dos sistemas IP SL/goma de guar (concentração de proteína de 13 g/dL), a pH 7: (A) 0,2 g/dL de guar; (B) 0,6 g/dL de guar.

3.5.4. Microscopia Confocal de Varrimento Laser

A observação microscópica dos géis de misturas IPSL/galactomananas, por CLSM, veio confirmar o que se constatou nas experiências reológicas, ou seja, que o efeito da amostra GG0H era muito diferente das restantes.

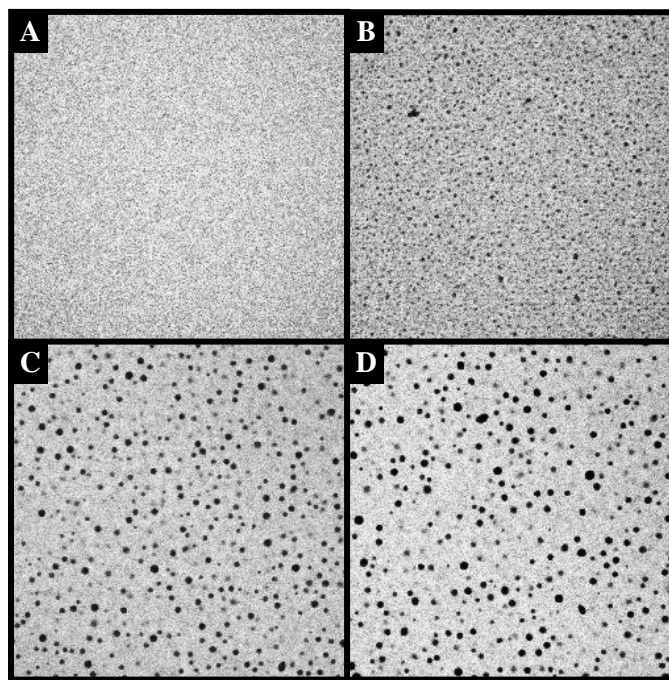


Figura 38 – Imagens CLSM de géis de IPSL 13 g/dL, corados com *Rodamina B*. (A) sem galactomanana; (B) GG0H 0,2 g/dL; (C) GT0H 0,2 g/dL e (D) GA0H 0,2 g/dL

Verificou-se que o gel de IPSL/GG0H tinha características muito mais próximas do gel de IPSL sozinho do que dos géis das restantes misturas. Notar que as zonas claras correspondem a proteína, devido à fluorescência da rodamina B a elas ligada na gama de comprimento de onda excitada, e as escuras a zonas sem proteína, na sua maioria compostas pelos polissacarídeos.

Tal como anteriormente (§ 3.4.2.2) a análise microestrutural revelou sistemas com separação de fases em que uma das fases é composta por proteína enquanto que a outra é rica em polissacarídeo. Para a concentração mais baixa de galactomanana testada (Figura 38) a fase dispersa consistia basicamente em pequenas gotas esféricas distribuídas no seio da fase dispersante. À medida que a concentração das galactomananas aumentou o tamanho das gotas aumentou e estas deixaram a sua forma esférica (Figuras 39 e 40). Para

as galactomananas menos ramificadas, com a concentração mais elevada, as gotas dispersas começaram a combinar-se originando uma nova fase contínua rica em polissacarídeo. Este comportamento não foi observado para a amostra de guar mais ramificada ($\text{man/gal} = 1,5$), podendo este facto estar relacionado com um impedimento das interacções galactomanana-galactomanana, interacções estas que são importantes para a existência de uma separação de fases.

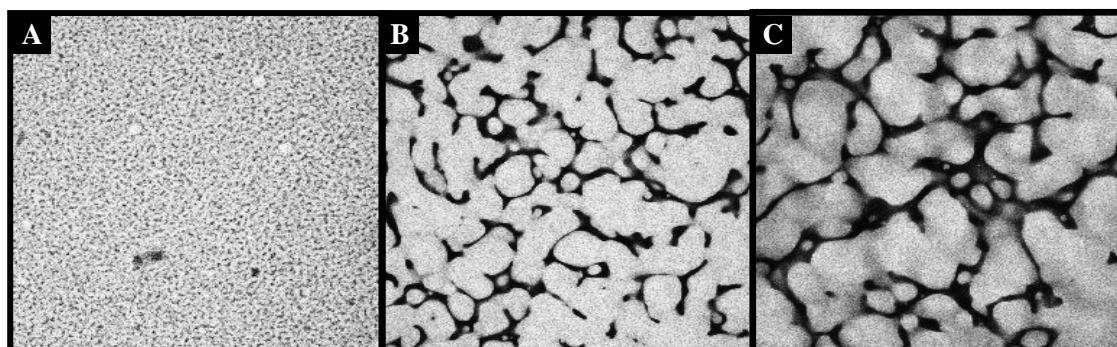


Figura 39 - Imagens CLSM de géis de IPSL 13 g/dL, corados com *Rodamina B*. (A) 0,6 g/dL GG0H; (B) 0,6 gd/L GT0H e (C) 0, 6 g/dL GA0H

Considerando as diferentes microestruturas observadas para os géis de IPSL/galactomanana para as duas concentrações de galactomananas estudadas, no caso das amostras com razões man/gal maiores, seria de esperar que o seu efeito no comportamento viscoelástico dos géis fosse mais pronunciado. No entanto, os perfis viscoelásticos dessas amostras são semelhantes (Figuras 36 e 37), podendo isto significar que o comportamento viscoelástico será pouco sensível a alterações microestruturais semelhantes às observadas.

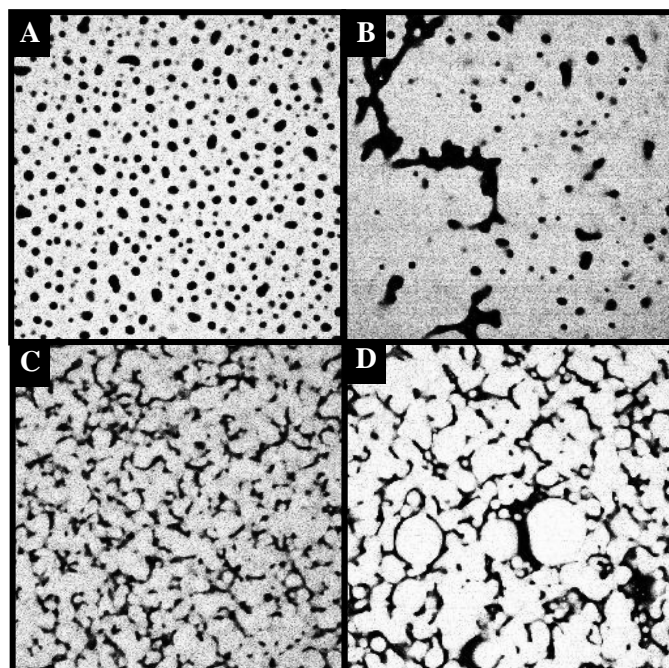


Figura 40 - Imagens CLSM de géis de IPSL 13 g/dL, corados com *Rodamina B*. (A) 0,2 g/dL GG6H; (B) 0,2 g/dL GG12H; (C) 0,6 g/dL GG6H e (D) 0,6 g/dL GG12H

Para as misturas de IPSL com as amostras de guar modificado, com razões man/gal diferentes, o efeito observado na microestrutura dos géis foi semelhante ao das restantes amostras, isto é, a microestrutura do gel varia com o grau de ramificação da galactomanana.

3.5.5. Conclusões

O efeito verificado foi claramente diferente para a goma de guar com o grau de ramificação mais baixo, comparando com todas as outras amostras estudadas. Assim concluiu-se que o grau de ramificação das galactomananas tem efeito na influência destes polissacarídeos nas propriedades viscoelásticas dos géis e também na sua microestrutura. Contudo este efeito parece estar limitado a uma determinada gama de razões man/gal abaixo da qual o é insignificante.

Referências

- Aguilera, J. M. (1995). Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 10, 83-89.
- Alting, A. C.; de Jongh, H. J.; Visschers, R. & Simons, J.-W. (2002). Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4682-4689.
- Baeza, R. I. & Pilosof, A. M. (2002). Calorimetric studies of thermal denaturation of β -lactoglobulin in the presence of polysaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35, 393-399.
- Beaulieu, M.; Turgeon, S. L. & Doublier, J.-L. (2001). Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, 11, 961-967.
- Beer, M. U.; Wood, P. J. & Weisz, J. (1999). A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. *Carbohydrate Polymers*, 39, 377-380.
- Blanshard, J. M. V. (1982). *Progress in Food and Nutrition Science*, 6, 3.
- Bottomley, R. C.; Evans, M. T. A. & Parkinson, C. J. (1990). Whey Proteins. Em Harris, P. (Ed.), *Food Gels* (p. 435-466). Elsevier Applied Science, England.
- Boye, J.; Alli, I.; Ismail, A.; Gibbs, B.; Konishi, Y. (1995). Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. *International Dairy Journal*, 5, 337-353.
- Bryant, C.M. ; McClements, D.J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 143-151.
- Bryant, C.M. ; McClements, D.J. (2000). Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food hydrocolloids*, 14, 383-390.
- Capron, I.; Nicolai, T. & Durand, D. (1999, a). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin in the presence of ι -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 13, 1-5.
- Capron, I. ; Nicolai, T. & Smith, C. (1999, b). Effect of addition of κ -carrageenan on the mechanical and structural properties of β -lactoglobulin gels. *Carbohydrate Polymers*, 40, 233-238.
- Clark, A. H. & Ross-Murphy (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.

- Clark, A. H.; Mavanagh, G. M. & Ross-Murphy (2001). Globular protein gelation – theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15, 383-400.
- Covas, A. G. & Maia, J. M. (2001). Reometria. Em Castro, A. G.; Covas, J. A. & Diogo, A. C. (Eds.), *Reologia e suas Aplicações Industriais* (p. 89-130). Coleção Ciência e Técnica, Instituto Piaget, Lisboa.
- Daas, P.J. H.; Schols, H. A. & de Jongh, H. H. J. (2000). On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydrate Research*, 329, 609-619.
- Dea, I. C. & Morrison, A. (1975). Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 241-312.
- de Kruif, C. G. & Tuiner, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, 555-563.
- Deuel, H. & Neukom, H. (1954). Some properties of locust bean gum. *Advances in Chemistry Series* (ACS), 11, 51.61.
- de Wit, J. N. (1989). Functional Properties of Whey Proteins. Em Fox, P. F., (Ed), *Developments in Dairy Chemistry – 4* (p. 285-321). Elsevier Science Publishers Lda., England.
- Doublier, J. L & Launay, B. (1981). Rheology of galactomannan solutions : comparative study of guar gum and locust bean gum. *Journal of Texture Studies*, 12, 151-172
- Doublier, J.L. ; Garnier, C. ; Renard , D. & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 202-214.
- Eleya, M. M. & Turgeon, S. L. (2000, a). Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 29-40.
- Eleya, M. M. & Turgeon, S. L. (2000, b). The effects of pH on the rheology of β -lactoglobulin/ κ -carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 245-251.
- Fernandes, P. B. (1994). Viscoelastic characteristics of whey protein systems at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 8, 277-285.
- Fernandes, P. B. (1995). Influence of galactomannan on the structure and thermal behaviour of Xanthan/galactomannan mixtures. *Journal of Food Engineering*, 24, 269-283.
- Ferry, J. D. (1948). Protein gels. *Advances in Protein Chemistry*, 4, 1-78.
- Gaisford, S. E.; Harding, S. E.; Mitchell, J. R. & Bradley, T. D. (1986). A comparison between the hot and cold water fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers*, 6, 423-442.

- Gezimati, J.; Creamer, L. K. & Singh, H. (1997). Heat-induced interactions and gelation of mixtures of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1130-1136.
- Gonçalves, M. P.; Torres, D.; Andrade C. T.; Azero, E. G.; Lefebvre, J. (2004, a). Rheological study of the effect of *Cassia javanica* galactomannans on the heat-set gelation of a whey protein isolate at pH7. *Food Hydrocolloids*, 18, 181-189.
- Gonçalves, M. P.; Sittikiyothin, W.; Silva, m. V. & Lefebvre, J. (2004, b). A study of the effect of locust bean gum on the rheological behaviour and microstructure of a β -lactoglobulin gel at pH 7. *Rheologica Acta*, 43, 472-481.
- Goycoolea, F. M.; Morris, E. R. & Gidley, M. J. (1995). Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of “hyperentanglement” in solution. *Carbohydrate Polymers*, 27, 69-71.
- Hegg (1982). Conditions for the formation of heat induced gels of some globular food proteins. *Journal of Food Science*, 47, 1241-1244.
- Hermansson, A-M; Langton, M.; Lorén (2000). New approaches to characterizing food microstructures. *MRS Bulletin*, December, 30-36.
- Hoffmann, M. A. & van Mil, P. J. (1997). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2942-2948.
- Ikeda, S.; Nishinari, K.; & Foegeding, E. A. (2001). *Biopolymers*, 59, 109-119.
- Kaláb, M.; Allan-Wojtas, P. & Miller, S. S. (1995). Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Science and Tecnology*, 6, 177-186.
- Kavanagh, G. M.; Clark, A. H. & Ross-Murphy (2000). Heat induced gelation of globular proteins: 4. Gelation of low pH β -lactoglobulin gels. *Langmuir*, 16, 9584-9594.
- Kazmierski, M.; Corredig, M. (2003). Characterization of soluble aggregates from whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 17, 685-692.
- Kuhn, P. R. & Foegeding, E. A. (1991). Mineral salt effects on whey protein gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (6), 1013-1016.
- Langton, M. & Hermanson, A. M. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobuline and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, 5, 523-539.

- Lazaridou, A.; Biliaderis, C. G. & Izydorczyk, M. S. (2000). Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 68-75.
- Lefebvre, T.; Subirade, M. (2000). Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate β -lactoglobulin gels. *Biopolymers*, 54, 578-586.
- Lopes da Silva, J. A. & Gonçalves, M. P. (1990). Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids*, 4, 277-287.
- Lopes da Silva, J. A.; Gonçalves, M. P.; Doublier, J. L. & Axelos, M. A. (1996). Effect of galactomannans on the viscoelastic behaviour of pectin/calcium networks. *Polymer Gels and Networks*, 4, 65-83.
- Lopes da Silva, J. A.; Cardoso, S. M.; Tavares, C. & Monteiro, S. R. (2004). Reologia de Biopolímeros: Dispersões e Géis. Em Gil, H. Burrows, H.; (Eds.), *Química de Polímeros* (p. 571-590). Imprensa da Universidade, Coimbra.
- Lyster, R. L. J. (1972). Review of the progress of dairy science, section C. Chemistry of milk proteins. *Journal of Dairy Research*, 39, 279.
- Manguino, M. E. (1992). Gelation of whey protein concentrates. *Food Technology*, January 1992, 114-117.
- Manoj, P.; Kasapis, S. & Hember, M. W. N. (1997). Sequence-dependent kinetic trapping of biphasic structures in maltodextrin-whey protein gels. *Carbohydrate Polymers*, 32, 141-153.
- McCleary, B. V. (1981). Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. *Carbohydrate Research*, 92, 269-285.
- McCleary, B. V.; Clark, A. H.; Dea, I. C. M. & Rees, D. A. (1985). The fine structures of of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Research*, 139, 237-260.
- Mitchell, J. R. (1984). Rheological Techniques. Em Gruenwedel, D. W. Whitaker, J. R. (Eds.), *Food Analysis: Principles and Techniques* (p. 152-220). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Monahan, F. J.; German, J. B. & Kinsella, J. E. (1995). Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 46-52.
- Monteiro, S. R.; Tavares, C.; Evtuguin, D. V.; Moreno, N. & Lopes da Silva (2005). Influence of galactomannans with different molecular weights on the gelation of whey proteins at neutral pH. *Biomacromolecules*, em impressão.

- Morr, C. V. (1989). Whey Proteins: Manufacture. Em Fox, P. F., (Ed), *Developments in Dairy Chemistry – 4*. (pp. 245-284). Elsevier Science Publishers Ltd., England.
- Morr, C. V. & Foegeding, E. A. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, 44, 100-105.
- Morr, C. V. (1992). Improving the texture and functionality of whey protein concentrate. *Food Technology*, January 1992, 110-113.
- Morris, E. R.; Cutler, A. N.; Ross-Murphy, S. B.; Rees, D. A. & Price, J. (1981). The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 1, 5-21.
- Morris, E. R. (1995). Polysaccharide rheology and in-mouth perception. Em Stephan, A. M. (ed), *Food Polysaccharides and their applications* (pág. 517-547). Marcel Dekker, New York.
- Mulvihill, D. M. & Kinsella, J. E. (1988). Gelation of β -lactoglobulin: effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. *Journal of Food Science*, 53, 231-236.
- Ndi, E. E.; Swanson, B. G. ; Barbosa-Canovas, G. V. & Luedecke, L. O. (1996). Rheology and microstructure of β -lactoglobulin/sodium polypectate gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 86-92.
- Neukom, H. (1989). Galactomannans: properties and applications. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 22, 41-45.
- Olsson, C.; Stading, M. & Hermanson, A.-M. (2000). Rheological influence of non-gelling amylopectins on β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 14, 473-483.
- Olsson, C.; Langton, M. & Hermanson, A.-M. (2002). Dynamic measurements of β -lactoglobulin structures during aggregation, gel formation and gel break-up in mixed biopolymer. *Advances in Food Colloids*, 16, 477-488.
- Pai, V. & Khan, S. A. (2002). Gelation and rheology of xanthan/enzyme-modified guar blends. *Carbohydrate Polymers*, 49, 207-216.
- Rao, M. A. (1986). Rheological properties of fluid foods. Em Rao, M. A. & Rizvi, S. S. H. (Eds.), *Engineering Properties of Foods* (p. 1-47). Food Science and Technology, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Renard, D. & Lefebvre, J. (1992). Gelation of globular proteins : effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation. A simple model and its application to β -lactoglobulin heat-induced gelation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 287-291.

- Richardson, P. H.; Willmer, J. & Foster, T. J. (1998). Dilute solution properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions. *Food Hydrocolloids*, 12, 339-348.
- Rojas, S. A.; Goff, H. D.; Senaratne, V.; Dagleish, G. & Flores, A. (1997). Gelation of commercial fractions of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin. *International Dairy Journal*, 7, 79-85.
- Ross-Murphy, S. B. (1984). Rheological Methods. Em Chan, H. W.-S. (Ed.), *Critical Reports on Applied Chemistry*, vol 5 (p. 139-199). Published for the Society of Chemical Industry by Blackwell Scientific Publications, London.
- Samant, S. K.; Singhal, R. S.; Kulkarni, P. R. & Rege, D. V. (1993). Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 547-562.
- Shim, J. & Mulvaney, S. J. (2001). Effect of heating temperature, pH, concentration and starch/whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch/whey protein mixed gels. *Journal of the Science of food and agriculture*, 81, 706-717.
- Shimada, K. & Cheftel, J. C. (1988). Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/dissulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 1018-1025.
- Schmidt, R. H. (1981). Gelation and coagulation. Em Cherry, J. P. (Ed), *Protein Functionality in Foods* (p.131). ACS Symposium Series 147, USA.
- Stading, M.; & Hermanson, A.-M. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 4, 121-135.
- Stading, M.; Langton, M. & Hermanson, A.-M. (1993). Microstructure and rheological behaviour of particulate β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, 7, 195-212.
- Steffe, J. F. (1992). Introduction to rheology. Em *Rheological methods in Food Process Engineering* (p. 1-93), Ed. Freeman Press, USA.
- Sousa, I. (2001). A reologia dos produtos alimentares. Em Castro, A. G.; Covas, J. A. & Diogo, A. C. (Eds.), *Reologia e suas Aplicações Industriais* (p. 131-158). Coleção Ciência e Técnica, Instituto Piaget, Lisboa.
- Syrbe, A.; Fernandes, P. B.; Dannenberg, F.; Bauer, W. & Klostermeyer, H. (1995). Whey protein-polysaccharide mixtures : polymer incompatibility and its application. Em Dickinson E. & Lorient D. (Ed.), *Food Macromolecules and Colloids* (p. 328), Cambridge, The Royal Society of Chemistry.
- Tang, Q.; McCarthy, O. J. & Munro, P. A. (1993). Oscillatory rheological study of gelation mechanism of whey protein concentrate solutions: effects of physicochemical variables on gel formation. *Journal of Dairy Research*, 60, 543-555.

- Tolstoguzov, V. B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 429.
- Tolstoguzov, V. B. (1998). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. Em Hill, S. E.; Ledward, D. A. & Mitchel, J. R. (Eds.), *Functional Properties of Food Macromolecules* (p. 252-277). Aspen Pubkishers, Inc., UK.
- Tolstoguzov, V. B. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.
- Trudso, J. E. (1991). Hydrocolloids. Em Smith, J. (Ed.), *Food Additive User's Handbook* (p.223-235). Blackie Academic & Professional, UK.
- Verheul, M. & Roefs, S. P. F. (1998). Structure of particulate protein gels: effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4909-4916.
- Wang, Q.; Ellis, P. R. & Ross-Murphy, S. B. (2003). Dissolution Kinetics of guar gum powders – II. Effects of concentration and molecular weigth. *Carbohydrate Polymers*, 53, 75-83.
- Weinbreck, F.; Nieuwenhuijse, H.; Robijn, G. W. & de Kruif, C. G. (2004). Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3550-3555.
- Wientjes, R. H. W.; Duits, M. H. G. ; Bakker, J. W. P. ; Jongschaap, R. J. J. & Mellema, J. (2001). Liner viscoelastic behavior of enzymatically modified guar gum solutions : structure, relaxations, and gel formation. *Macromolecules*, 34, 6014-6023.
- Zayas, Joseph F. (1997). Gelling Properties of proteins (p. 310-366). Em *Functionality of Proteins in Food*, Springer – Verlag, Berlin Heidelberg.
- Zhang, G.; Foegeding, E. A. (2003). Heat-induced behaviour of β -lactoglobulin/polysaccharide mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17, 785-792.